UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
APR 20 '51

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Bern Zürich Genève
Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

Vol. VII. – Fasc. 3 15. III. 1951 Fr. 3.–

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

C. ARNAUDI: Oxydation microbiennes des stéroïdes 81
G. MORUZZI: Le risposte a reclutamento in rapporto alla fisiologia dei nuclei talamici a proiezione diffusa 89

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

C. DJERASSI and G. ROSENKRANZ: Steroids XV. The Bromination of 3-Ketosteroids of the Normal Series 93
D. GINSBURG: The Action of *t*-Butyl Hypochlorite on 1-Methyl-4-isopropyl-3-cyclohexene [*p*-Menthene-(3)] . . . 95
H. SCHWANDER et R. CERF: Etude de la molécule d'acide thymonucléique par des mesures de biréfringence d'écoulement dans des solvants de viscosité variable 95
K. DIALER, A. STUDER und K. VOGLER: Zur Molekulargewichtsverteilung von Blutersatzpräparaten aus Polyvinylpyrrolidon 96
L. A. PÁLOS and CH. KOCSÁN: New Data on the Physico-chemical Properties of Heparin 97
M. K. SUBRAMANIAM and L. S. PRAHLADA RAO: Lyophilization and Mutation in Yeast 98
A. ZEHNDER: Über den Einfluß antibiotischer Stoffe auf das Wachstum von Grünalgen 99
J. PANIJEL: Evolution des granules cytoplasmiques et conditions de synthèse des ribonucléoprotéines 100
M. U. DIANZANI: Preparation of Rabbit Anti-Serum for Rat-Liver Mitochondria. Its Action on Mitochondria Succinoxidase 102
NORA BARGONI: Enzymatic Activity and Protein Amounts in the Liver 104
M. ZACCO e G. CIASCA: Cloroamine e anergia mesenchimale 105
P. SCHLECHTER: Endocrine Activity of the Spermatogenic Tissue demonstrated in the Rat by Means of the Administration of Large Quantities of Gonadotrophins 106
P. REDAELLI, C. CAVALLERO, M. BORASI, G. SALA e A. AMIRA: Effetto del 17-Idrossi 11-Deidrocorticosterone (Cortisone) sulla Granulomatosi coccidioide sperimentale 108
TH. BÜCHER und V. KRÜGER: Färbung der Hartsubstanzen von Zähnen durch vitale Reduktion von Tetrazoliumchlorid 109
H. BORNSCHEIN und F. KREJCI: Zur Frage einer selektiven Ultraschallwirkung auf die Cochlear- und Aktionspotentiale des Innenohres 109
K. BUCHER: Eine einfache und empfindliche Methode zur biologischen Histaminbestimmung in kleinen Flüssigkeitsmengen (Pro Laboratorio) 111

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Das Polarisationsmikroskop. Von Conrad Burri (Verlag Birkhäuser AG., Basel 1950) (Ref. E. Baier) 113
Fortschritte der Alkaloidchemie seit 1933. Von Hans G. Boit (Akademie-Verlag, Berlin 1950) (Ref. E. Schlittler) . 113
Elemente der Botanik. Von E. Heitz (Springer-Verlag, Wien 1950) (Ref. A. Frey-Wyßling) 114

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Explicationes: F. ENDER: Über die Inkonsequenz unserer Zeitrechnung 114
Studiorum Progressus: R. WIESMANN, R. GASSER und H. GROB: Über ein neuartiges, selektives Aphizid mit Tiefenwirkung 117
Congressus 120

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi,* in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni,* come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings,* as well as through other communications.

E X P E R.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Prix du numéro fr. 3.–. Abonnement pour un an fr. 28.— pour la Suisse; pour l'étranger fr. 34.—. Ces prix s'entendent en francs suisses.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 35 jours avant la darution, c'est-à-dire le 10 du mois pour le numéro du mois suivant
Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à par. de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 200.—, $^1/_2$ page fr. 120.—, $^1/_4$ page fr. 70.—. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhæuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 49800; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Portugal, Schweden und Tschechoslowakei nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.
Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 28.—, im Ausland sFr. 34.—; die Einzelnummer kostet Fr. 3.–.
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschließlich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluß 35 Tage vor Erscheinungstermin, d.h. am 10. des Monats für den folgenden Monat.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 200.—, $^1/_2$ Seite Fr. 120 — $^1/_4$ Seite Fr. 70.—; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstraße 15
Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. Il prezzo del singolo fascicolo è di fr. 3.–. L'abbonamento annuo è di fr. 28.— per la Svizzera; all'estero fr. 34.—. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fascicolo si chiude 35 giorni prima del termine di pubblicazione, cioè al 10 del mese, per il mese seguente.
Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 200.—, $^1/_2$ pag. fr. 120.—, $^1/_4$ pag. fr. 70.—; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhæuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 49800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

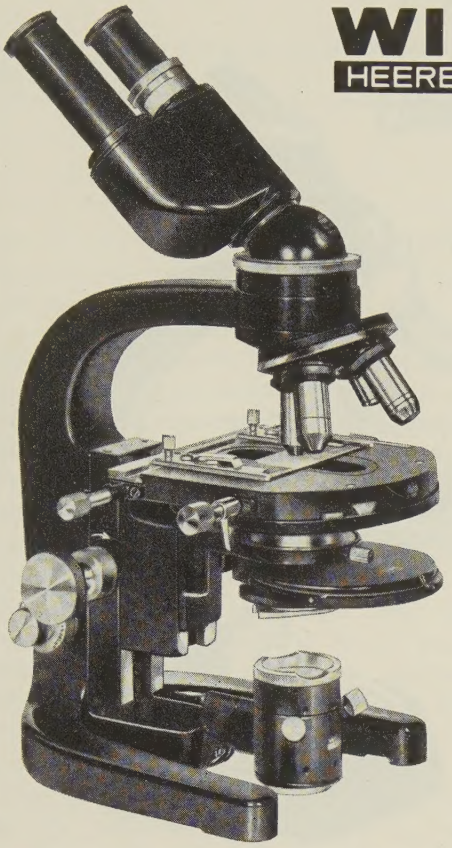
EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price per number is fr. 3.–, by annual subscription by inland-mail fr. 28.—; other countries fr. 34.—. Prices in Swiss currency.
All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers on the 10th of the preceding month.
The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 200.—, $^1/_2$ page fr. 120.—, $^1/_4$ page fr. 70.—. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 49800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia VII/3

CIBA AG., Basel
Kern & Co. AG., Aarau
Cilag AG., Schaffhausen
Sauter AG., Basel
Trüb, Täuber & Co. AG., Zürich
Birkhäuser AG., Basel
Steiner & Co., Basel
Ganz & Co., Zürich
H. Wild, Heerbrugg
Salvis AG., Luzern



WILD
HEERBRUGG

Ein Erzeugnis der
Schweizerischen Präzisionsindustrie

WILD-MIKROSKOP M 10

Hohe Stabilität des Stativs, da feste Verbindung zwischen Fuß und Stütze.

Bequem angeordnete, tiefliegende Bedienungsknöpfe.

Eingebaute Stromzuführungen für Durchlicht- und Auflichtbeleuchtung von einem gemeinsamen Stecker aus.

Neue, leistungsfähige Fluotarobjektive mit Präparatschutz (gefederte Fassung).

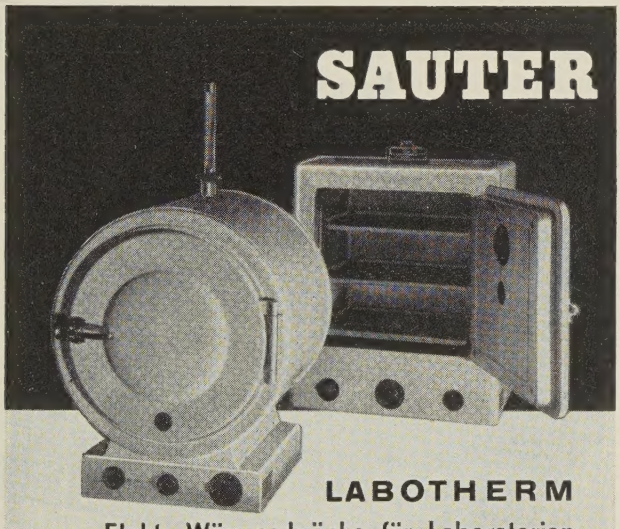
Empfehlenswertes Zubehör: Praktische Ansteckлampe für subjektive Beobachtungen – Neue, sehr leistungsfähige Niedervolt-Mikroskopierlampe für Mikrophotographie – Moderne, leichte Mikrokamera – Phasenkontrasteinrichtung.

Ausführliche Beschreibung im neuen Katalog Mi 511

Verkaufs-AG. Heinrich Wild's geodätische Instrumente, Heerbrugg

Fabriken für Optik und Feinmechanik - Tel. (071) 72433

SAUTER



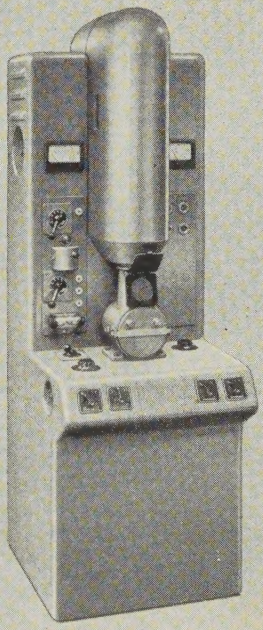
LABOTHERM

Elektr. Wärmeschränke für Laboratorien

Prüfschränke für Farben und Lacke
Härteprüfung von Kunststoffen
Dichte - Feuchtigkeit - Säuregehaltprüfungen, Vorwärmung u.s.w.
Trockenschränke, Sterilisatoren
Brut- und Labschränke, Vakuumschränke

FR. SAUTER A.G.,
FABRIK ELEKTRISCHER APPARATE, BASEL

Universal Kathodenstrahloszillograph



Der Oszillograph eignet sich besonders für Stossprüfanlagen und Untersuchungen von Abschaltvorgängen usw.

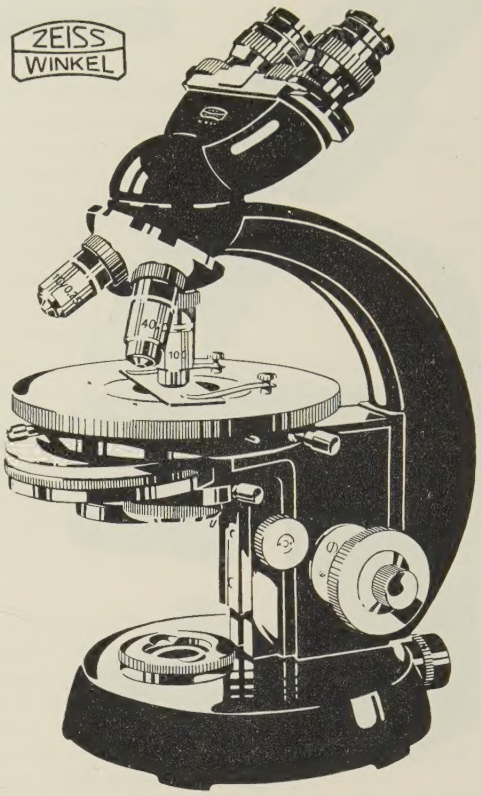
Seine Hauptdaten sind folgende:
Eingebaute Hochspannungsanlage für 15, 25, 35 und 45 kV.
Empfindlichkeit in V/mm:
für die Zeitachse:
0,55 × Anodenspannung in kV;
für die Meßspannung:
0,44 × Anodenspannung in kV.
Strichschärfe: 0,03—0,3 mm.
log. Zeitablenkung 1 µs—1000 µs
lin. Zeitablenkung 1000 µs—1 s
einmalig und wiederholt
Einschwingzeit: 0,2 µs
Registrierformat: 6 × 6 cm
Registriervermögen: 10—15 Perioden pro mm.

Besuchen Sie uns an der MUBA, Stand 1232, Halle V

Trüb, Täuber & Co. AG.

Fabrik elektrischer Meßinstrumente und wissenschaftlicher Apparate, Zürich

NEUES **ZEISS**-WINKEL
STANDARD-MIKROSKOP GF 524



- **Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhler'sches Prinzip)**
- **Koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung**
- **Neuartiger Gleittisch (Fettfriktion)**
- **Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive**
- **Vergrösserungswechsler für die Okulare**
- **Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor**

Auskunft und Vorführung durch die Generalvertretung für die Schweiz:

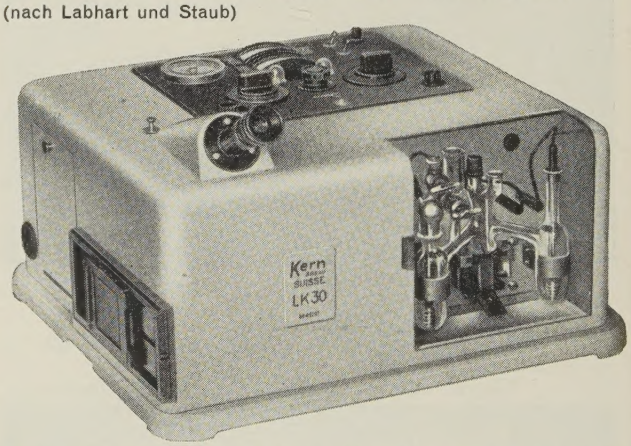
GANZ & Co *Zürich*

Bahnhofstrasse 40
Tel. (051) 23 97 73

Elektrische **Trocken- und Sterilisierschränke**
Bakterienbrutschränke
Kleintiegel- und Muffelöfen
Sand- und Wasserbäder
Heizkalotten
Wasserdestillierapparate
Heizplatten und Heiztrichter
Spezialapparate-Konstruktionen aller Art für Laboratorien

Mikro-Elektrophoreseapparat Kern LK 30

mit interferometrischer Ausmessung der Konzentrationsstufen (nach Labhart und Staub)



Benötigte Lösungsmenge 0,4 cm³. Genauigkeit ca. 2,5% bei 1%iger Lösung. Spiegelreflex-Kamera, automatische Bildnumerierung, kein Thermostat, sofortige Betriebsbereitschaft, Spezialzelle für Diffusionsversuche. Maße: 40 x 46 x 28 cm; Gewicht: 24 kg.

Anwendungen: Serum und Plasma, Rückenmarksliquor, Organ-Eiweiße, Fermente, Immunisierungsvorgänge, Chemie der Hochmolekularen usw. - Prospekt Med. 505/2 auf Verlangen.

Der Mikro-Elektrophoreseapparat LK 30 wird an der MUBA 1951 gezeigt, Stand Nr. 2610, Halle IIIb, 2. St.

Kern & Co. AG., Aarau

Werkstätten für Präzisions-Mechanik und Optik
Gegründet 1819 Telephon (064) 2 11 12

Kern AARAU

EXPERIENTIA

Vol. VII - Fasc. 3 Pag. 81–120 15. III. 1951

Oxydations microbiennes des stéroïdes

Par CARLO ARNAUDI[1], Milan

La notable diffusion du cholestérol dans les tissus des végétaux et des animaux, ainsi que ses rapports avec des substances importantes (telles que les acides biliaires, la vitamine D et quelques hormones – entre autres le corticostérone et surtout les hormones sexuelles) ont posé depuis longtemps le problème des modalités de sa synthèse, de son évolution chimique et de sa décomposition.

Nos connaissances à ce sujet sont toutefois très lacunaires. Cela tient en partie au fait que l'étude des transformations et dégradations enzymatiques du cholestérol, qui nous intéressent ici plus spécialement, est rendue particulièrement difficile par l'insolubilité presque totale du cholestérol dans l'eau.

Alors qu'une faible hydrolyse transforme les graisses dans des composés plus ou moins hydrosolubles, la dégradation du cholestérol implique l'intervention, bien plus énergique, d'enzymes oxydo-réducteurs. Il faut rappeler encore que les suspensions pseudo-colloïdales qu'on obtient avec le cholestérol sont douées d'activité bathotone et il est en outre bien connu (KOPACZEWSKY, FROBISER, ARNAUDI, KOPACZEWSKY et ROSNOWSKY[2], LASSEUR et collaborateurs[3]) que le développement des microbes est arrêté dans les liquides de culture dont la tension superficielle est tombée jusqu'à une limite qui varie d'espèce à espèce et qui se trouve être entre 30,6 et 50 dine/cm^2.

C'est peut être à cette propriété physique qu'il faut attribuer, tout au moins en partie, la relative résistance du cholestérol à l'attaque microbienne, d'où résulte l'opinion, assez répandue, que cette substance est à peu près inattaquable par les microorganismes. De plus, certains auteurs admettent que le cholestérol peut exercer quelques fois une activité antibactérienne. RABB[4] admet en effet que le cholestérol, l'ergostérol et la vitamine D, ayant en commun le noyau phénantrénique, ont aussi en commun une activité antibactérienne, capable d'arrêter *in vivo* la multiplication des mycobactéries et d'empêcher le développement du *Staphylococcus aureus*, lorsque ces substances sont introduites dans le milieu de culture.

E. W. SQUIRE et E. N. SQUIRE[1] reprenant et approfondissant la question, ont recherché l'effet de plusieurs stéroïdes (bicholestéryle, chlorure et bromure de cholestéryle, cholestéryle-p-toluène, 5-cholestène, 3,5-cholestadiène, cholestérol) sur *Streptococcus lactis, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Sarcina lutea, Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus, Alcaligenes faecalis, Aërobacter aërogenes, Escherichia coli, Eberthella typhosa, Salmonella schottmuelleri, Shigella paradysenteriae, Bacillus subtilis, Bacillus megatherium*. Les résultats de ces auteurs conduiraient à la conclusion que le bicholestéryle n'exerce aucune action sur le développement des bactéries étudiées. Par contre, le chlorure et le bromure de cholestéryle inhiberaient le développement de *Klebsiella pneumoniae* et de *Streptococcus lactis;* le cholestéryle-p-toluène sulphonate et le 5-cholestène de même inhiberaient le *Streptococcus lactis*, le 3,5-cholestadiène inhiberait *Escherichia coli* et enfin, le cholestérol inhiberait *Aërobacter aërogenes, Shigella paradysenteriae, Klebsiella pneumoniae*, tout en stimulant au contraire de *Alcaligenes faecalis* et *Salmonella schottmuelleri*.

Le fait est que jusqu'à il y a dix ans nous n'avions au sujet de l'utilisation du cholestérol par les microbes que les observations de SOEHNGEN[2], effectuées sur les bactéries qui agissent sur les paraffines. En employant des cultures par agrandissement au moyen de milieux de culture contenant des hydrates de carbone, SOEHNGEN a isolé en effet des mycobactéries capables de se développer dans des milieux dont l'unique source de carbone était le cholestérol.

L'activité enzymatique des microorganismes est toutefois tellement multiple et douée souvent d'une spécificité si étroitement délimitée, qu'il est logique de présumer qu'il existe dans la nature des microbes aptes à exercer sur toutes les substances végétales et animales une activité biochimique tout à fait particulière.

C'est sur la base de cette conception et en considérant le sol agraire comme étant en fait le siège des phénomènes enzymatiques les plus divers, capables de causer la dégradation de toutes les substances organiques, que le Hollandais TAK[3] et l'Anglais TURFITT[4], indépendamment l'un de l'autre et en même temps,

[1] Institut de Microbiologie générale, agricole et technique de l'Université de Milan.

[2] C. ARNAUDI, W. KOPACZEWSKI et M. ROSNOWSKI, Boll. Istituto Sieroterapico milanese, N. 5 (1927).

[3] PH. LASSEUR, P. VENIER, A. DUPAIX et L. GEORGES, Arch. Mikrobiol. *3*, 5 (1932).

[4] W. RABB, Science *103*, 670 (1946).

[1] E. W. SQUIRE et E. N. SQUIRE, J. Bact. *55*, 766 (1948).

[2] N. L. SOEHNGEN, Cbl. Bakt., II. Abt., 1913.

[3] J. D. TAK, Ant. Leeuwenhoek J. Mikrobiol. Serol. *8*, 32 (1942).

[4] G. E. TURFITT, J. Bact. *47*, 487 (1944).

ont affronté entre 1942 et 1943 le problème de la décomposition microbienne du cholestérol dans le sol agraire.

Les recherches sur la sensibilité des stéroïdes à l'action des microorganismes datent toutefois de 1939. D'importants résultats ont été acquis depuis en étudiant les actions exercées par les microbes sur des substances dérivées du cholestérol, mais dépourvues de la chaîne latérale.

Oxydation des stéroïdes à action hormonale

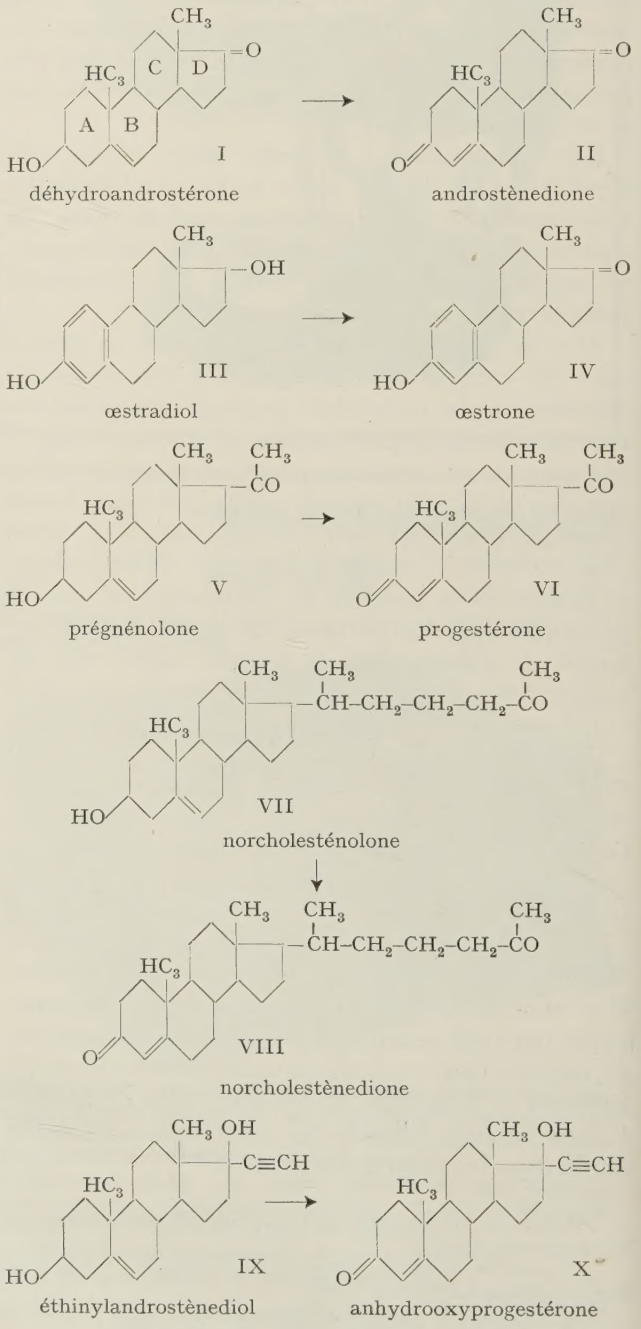
La propriété qu'ont les stéroïdes et surtout le déhydroandrostérone d'être oxydés par les microorganismes et transformés en androstènedione a été démontrée pour la première fois en 1939 par MAMOLI, KOCH et TESCHEN[1]. Cette action a été attribuée à un microorganisme très petit dénommé d'abord *Corynebacterium helvolum*, mais classifié par la suite comme *Corynebacterium mediolanum*. Par étapes, il a été possible de démontrer (ARNAUDI, 1943[2]) que la culture employée par les auteurs susdits au cours de leurs oxydations n'était pas une culture pure, mais un mélange de différents microbes. Quelques uns, présentant de l'affinité entre eux, pouvaient se rattacher à l'espèce *Flavobacterium dehydrogenans;* d'autres possédaient des propriétés physiologiques analogues (pouvoir hydrolytique très limité, activité oxydante remarquable), mais ne pouvaient faire partie du genre *Flavobacterium* et, surtout, ils n'agissaient pas sur les stéroïdes, d'autres encore étaient des bactéries de contamination, dépourvues d'activité oxydante.

Au cours de la même année, ARNAUDI[3] isolait un microbe présentant en culture pure la même propriété oxydante; il le dénomma d'abord *Micrococcus dehydrogenans* (1939), puis *Flavobacterium dehydrogenans*[4]. L'étude du pouvoir oxydant de ce microorganisme a été élargie et approfondie par A. ERCOLI[5], qui a pu démontrer qu'il exerçait, comme on le verra plus loin, une activité oxydante notable sur plusieurs stéroïdes de la série des hormones sexuelles.

En 1941, ARNAUDI et ERCOLI[6] isolaient un autre microorganisme (déterminé par la suite comme *Bacterium steroidiclasium*), capable d'opérer une démolition profonde de la molécule des stéroïdes du groupe de l'androstène, c'est-à-dire le déhydroandrostérone et l'androstènedione, de sorte que dans les liquides de réaction, il ne reste plus aucune trace de produits à structure moléculaire polycyclique. Le même microorganisme est capable, au contraire, d'oxyder l'œstradiol en œstrone. Enfin, en 1944 MOLINA et ERCOLI[7] ont isolé deux autres flavobactéries: *Flavobacterium androstendionicum* et *Flavobacterium carbolinicum*, qui exercent une activité de degré variable sur les stéroïdes employés dans ces essais.

Microorganismes oxydant les stéroïdes

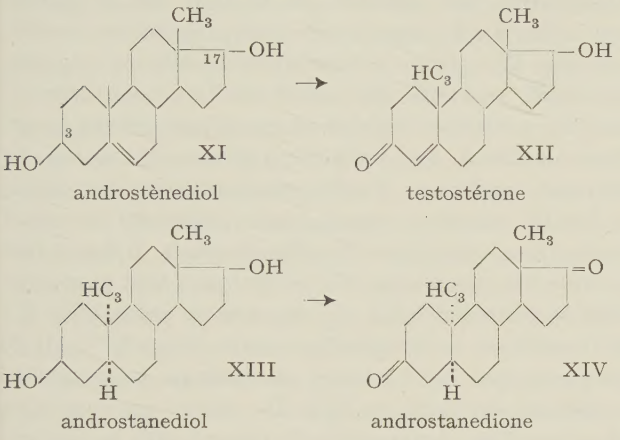
1° *Flavobacterium dehydrogenans.* A. ERCOLI[1] a démontré que *Flavobacterium dehydrogenans* peut oxyder non seulement le déhydroandrostérone (I) en androstènedione (II), mais aussi l'œstradiol (III) en œstrone (IV); le prégnénolone (V) en progestérone (VI); le norcholesténolone (VII) en norcholestènedione (VIII); l'éthinylandrostènediol (IX) en anhydrooxyprogestérone (X) (prégnén-in-ol-one).



[1] L. MAMOLI, R. KOCH et H. TESCHEN, Naturwiss. *27*, 319 (1939).
[2] C. ARNAUDI, Boll. Istituto Sieroterapico milanese *21*, 1 (1942).
[3] C. ARNAUDI, Boll. sez. ital. Soc. int. Microbiol. N. 10 a 12 (1939).
[4] C. ARNAUDI, Zbl. Bakt., II. Abt., *105*, 352 (1942).
[5] A. ERCOLI, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie *270*, 266 (1941).
[6] C. ARNAUDI et A. ERCOLI, Boll. Istit. Sierot. mil. *20*, 137 (1941).
[7] L. MOLINA et A. ERCOLI, Boll. Istit. Sierot. mil. *23*, 164 (1944).

[1] A. ERCOLI, Boll. sc. Facoltà Chim. ind. Bologna N. 10 (1940).

Ercoli a mis encore en évidence une singulière propriété biochimique de *Flavobacterium dehydrogenans* au cours de l'oxydation de l'androstènediol (XI): un oxhydryle secondaire seulement, à savoir celui en position C_3, est oxydé en groupe cétonique, tandis que celui en position 17 reste inaltéré; il s'en suit la formation de testostérone (XII). Si, par contre, l'on soumet à l'action du *Flavobacterium* le composé saturé correspondant: l'androstanediol (XIII), on obtiendra l'oxydation des deux oxhydryles en groupes cétoniques, avec formation d'androstanedione (XIV).



2° *Flavobacterium androstendionicum.* Molina et Ercoli[1] ont démontré que *Flavobacterium androstendionicum* est capable d'oxyder le déhydroandrostérone (I) en androstènedione (II). Alors qu'il ne peut pas déshydrogéner de l'androstènediol (XI) en testostérone (XII) comme *Flavobacterium dehydrogenans,* il oxyde de l'androstanediol (XIII) en androstanedione (XIV). Ce microorganisme aurait donc un pouvoir oxydant moins spécifique mais plus prononcé de celui de *Flavobacterium dehydrogenans.*

3° *Flavobacterium carbolinicum. Flavobacterium carbolinicum* est capable de déshydrogéner le déhydroandrostérone (I) en androstènedione (II). Il serait doué toutefois d'un pouvoir oxydant intermédiaire entre celui de *Flavobacterium dehydrogenans* et celui de *Flavobacterium androstendionicum.* En effet, si l'on fait agir ce microbe sur l'androstènediol (XI), on constate la formation d'un mélange de testostérone (XII) et d'androstènedione (II). On aurait donc d'abord l'oxydation du groupe alcoolique secondaire en C_3 et ensuite une oxydation partielle de l'oxhydryle en C_{17}.

4° *Bacterium steroidiclasium.* Le *Bacterium steroidiclasium* expliquerait une activité bien plus énergique. Il attaque la molécule du déhydroandrostérone (I) et celle de l'androstènedione (II) en les désagrégant profondément: le produit qu'on peut récupérer des liquides après une oxydation de 15 jours, est identique à la substance de départ; il représente de 10 à 50% de cette dernière. Il est impossible d'isoler d'autres composés ayant encore la structure polycyclique primitive. Le *Bacterium steroidiclasium* agit, au contraire, sur l'œstradiol (III) en le transformant complètement en œstrone (IV) avec un rendement de 35% à peu près. Le reste de la substance demeure inaltéré, tout au moins en grande partie.

[1] L. Molina et A. Ercoli, Boll. Istituto Sieroterapico milanese, *23*, 164 (1944).

Caractéristiques du genre Flavobacterium

Les propriétés du genre *Flavobacterium* Bergey (que cet auteur comprend dans la famille des *Bacteriaceae* Cohn) sont limitées. Elles résident essentiellement dans son aptitude à former un pigment jaune orange, dans son inactivité presque totale vis-à-vis des hydrates de carbone et dans le fait qu'il ne produit pas de gaz. Nous donnerons ici les caractéristiques de *Flavobacterium dehydrogenans* sur lequel nous possédons un grand nombre de données expérimentales, mais nous ne négligerons pas d'ajouter des indications sur les autres espèces employées au cours des recherches sur les bio-oxydations. Il nous faut toutefois remarquer dès l'abord que parmi les espèces contrôlées par nous, beaucoup se sont montrées difficilement colorables avec les couleurs d'aniline courantes et ont présenté une variabilité morphologique accentuée, en relation avec le milieu de culture et l'âge.

Flavobacterium dehydrogenans peut avoir l'aspect d'un cocco-bactérium (μ 0,375–0,50 × 0,50–0,65) tout particulièrement dans les milieux de culture solides; dans les milieux de culture liquides, il peut présenter une longueur de 1–2 μ. Strictement aérobie. Gram-positif. *Optimum* de température 30–32°C. Inerte vis-à-vis du lait et de la gélatine, il ne fermente aucun des hydrates de carbone les plus communs. Il oxyde par contre assez énergiquement la glucose et la glycérine; d'une façon moins prononcée la saccharose, la galactose, la fructose, la maltose et aussi, quoique plus faiblement, l'arabinose. Le p_H *optimum* de développement est entre 6,8–7,1.

La pigmentation présente un intérêt tout particulier, *Flavobacterium dehydrogenans,* ainsi que tous les microorganismes appartenant au genre *Flavobacterium* soumis à l'étude (*Flavobacterium maris, Flavobacterium flavotennae,* souches AR 1 et AR 3) se comporte comme un parachromophore typique (suivant la classification de Beijerinck), puisqu'il garde dans ses enveloppes capsulaires le pigment jaune citron qu'il élabore. A l'encontre de ce qui se présente chez la presque totalité des bactéries pigmentées, la chromogénèse ne s'opère chez lui qu'à la lumière diffuse. Dans l'obscurité, la multiplication ne présente aucune anomalie morphologique, mais les cultures – soit en milieux liquides, soit en milieux gélosés – restent dépourvues de pigment.

La nature du milieu de culture a une unfluence nette sur la chromogénèse: celle-ci n'a pas lieu dans les milieux nutritifs minéraux et se manifeste par contre sans

anomalies dans les milieux de culture gélosés, soumis pour des temps variables (jusqu'à 60') aux irradiations d'une lampe à vapeurs de mercure, placée à 30 cm de distance. Dans les mêmes milieux de culture des autres microorganismes, tels que le *Staphylococcus aureus*, non seulement ne se pigmentent pas mais n'ont même pas la possibilité de se multiplier régulièrement, à cause de l'H_2O_2 formé à la suite du traitement d'irradiation (comme l'a démontré DIEUDONNÉ depuis longtemps).

La résistance à l'H_2O_2, qui, du reste, peut être élaboré par le *Flavobacterium dehydrogenans* lui-même, est très accentuée: en effet, ce microorganisme se multiplie encore en présence de 0,25 pour 1000 de H_2O_2, tandis que des doses de 0,04 pour 100 sont suffisantes pour arrêter la multiplication du *Staphylococcus aureus*.

La fonction du pigment au cours des processus d'oxydation déterminés par les flavobactéries est pour le moment tout à fait hypothétique. Tandis que la vitesse de multiplication ne paraît pas être influencée par le manque de lumière et par conséquent de pigment, les processus métaboliques en sont sûrement modifiés puisque l'abaissement du potentiel redox est plus intense dans l'obscurité (de rH_2 25,70 à 22,60 à $p_H = 6,9$) qu'à la lumière diffuse (de rH_2 25,70 à 24,56 à $p_H = 6,9$). Le pouvoir oxydant est lié lui aussi à la présence du pigment. Les cultures pigmentées manifestent un pouvoir respiratoire nettement supérieur à celui des cultures non pigmentées. La détermination manométrique suivant la méthode de Warburg démontre que les bactéries pigmentées métabolisent la glucose en alcool éthylique avec une intensité de 40 à 56 pour 100 plus élevée que celle observée pour d'autres bactéries différant des précédentes exclusivement par le manque de pigment. La respiration basale étudiée sur des suspensions en solution physiologique, se produit elle aussi avec réduction d'environ 50% chez les bactéries non pigmentées. Il faut ajouter que l'oxydation typique de *Flavobacterium dehydrogenans*, c'est-à-dire la transformation de la déhydroandrostérone en androstènedione, est de beaucoup diminuée dans le cas de cultures dépourvues de pigment.

Les caractères de *Flavobacterium androstendionicum*, *Flavobacterium carbolinicum*, *Flavobacterium maris*, *Flavobacterium flavotennae* et des souches AR 1, AR3 étudiés dans mon Institut varient très peu en ce qui concerne les dimensions, la couleur du pigment (qui est toujours entre le jaune citron et l'orange) et surtout les aptitudes hydrolytiques. Ces dernières, très limitées en tout cas, peuvent être observées quelques fois (*Flavobacterium carbolinicum*) sous forme de fluidification très lente de la gélatine, coagulation flasque du lait, production de H_2S, etc. Les aptitudes oxydantes des flavobactéries ne restent toutefois pas limitées aux stéroïdes seulement; elles s'exercent aussi, comme nous l'avons vu, sur quelques hydrates de carbone et en plus sur l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phénique, la phloroglucine, la pyrocatéchine, la résorcine, le toluène, le xylol, la paraffine; elles montrent une sorte de spécificité d'action qui, une fois approfondie, pourrait servir de caractéristique physiologique de certaines espèces et qui permettrait une définition bien plus commode que celle qui se base sur le comportement vis-à-vis des stéroïdes (ARNAUDI[1], ARNAUDI et COLLA[2], TRECCANI-BENETTI et SCHIESSER[3]).

Bacterium steroidiclasium

Pour compléter la revue des bactéries provoquant l'oxydation des stéroïdes de la série des hormones sexuelles, il faut rappeler encore le *Bacterium steroidiclasium*. Il s'agit d'une bactérie très petite, sans spores, immobile, mal colorable, ayant des dimensions moyennes de μ 0,8–1,2×0,3–0,4 et un comportement incertain au Gram. Sur les milieux gélosés communs, on obtient toujours un développement modéré. Sur gélose à l'infusé de levure on peut obtenir seulement un enduit blanchâtre, sous forme de pellicule mince. Il donne lieu à une lente coagulation du lait, qui pour finir se montre digéré et alcalinisé. Le p_H *optimum* est entre 6,5 et 7,1 et *l'optimum* de température entre 30 et 32°C. Il ne fermente pas les hydrates de carbone communs et n'élabore ni indol, ni H_2S. De même que quelques flavobactéries, il est capable d'utiliser l'acide benzoïque, l'acide salicylique, le toluène, le xylol et la paraffine.

Oxydation du cholestérol

Après les recherches indirectes et occasionnelles de SOEHNGEN[4], datant de 1913, sur l'utilisation du cholestérol par les mycrobactéries, les premières études systématiques que nous ayons à ce sujet sont celles de TAK[5] et de TURFITT[6]. Elles ont été faites entre 1942 et 1943. Mentionnons ensuite, par ordre chronologique, la série des recherches de TURFITT[7] (1944, 1947, 1948), les études de HORVATH et KRÁMLI[8] (1947, 1948, 1949), celles de ARNAUDI et COLLA[9] (1949), de SOBEL et PLAUT[10] (1949), de SCHATZ, SAVARD et PINTER[11] (1949) et de ARNAUDI[12] (1950).

Microorganismes à activité oxydante

A ce groupe de bactéries possédant l'aptitude de dégrader le cholestérol, il faut ajouter encore les

[1] C. ARNAUDI, Boll. Istituto Sieroterapico milanese, *23* (1944).
[2] C. ARNAUDI et C. COLLA, Soc. ital. Sc. biol. Milano (1944).
[3] R. TRECCANI-BENETTI et A. SCHIESSER, Ann. Microbiol. *4*, 69 (1949).
[4] N. L. SOEHNGEN, Cbl. Bakt., II. Abt., 1913.
[5] J. D. TAK, Ant. Leeuwenhoek J. Mikrobiol. Serol. *8*, 32 (1942).
[6] G. E. TURFITT, J. Bact. *47*, 487 (1944).
[7] G. E. TURFITT, Biochem. J. *38*, 492 (1944); *40*, 79 (1946); J. Bact. *54*, 557 (1947); Biochem. J. *42*, 376 (1948).
[8] J. HORVÁTH et A. KRÁMLI, Nature *160*, 639 (1947)]. – A. KRÁMLI et J. HORVÁTH, Nature *162*, 619 (1948)]; Nature *163*, 219 (1949)].
[9] C. ARNAUDI et C. COLLA, Exper. *2*, 120 (1949).
[10] H. SOBEL et A. PLAUT, J. Bact. *57*, 377 (1949).
[11] A. SCHATZ, K. SAVARD et I. PINTER, J. Bact. *57*, N. 2 (1949).
[12] C. ARNAUDI, Rend. Ist. lomb. Sc. e Lett. 1950.

schizomycètes qui ont été expérimentés par TURFITT dans un milieu de culture à base de sels minéraux et de cholestérol, dans le but d'en définir l'aptitude à métaboliser le cholestérol. Ce sont:

Chromobacterium violaceum Schroeter; *Alcaligenes faecalis* Castellani et Chalmers; *Vibrio cyclosites* Gray et Thornton; *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter; *Pseudomonas fluorescens* Migula; *Phytomonas malvaccarum* Erw. Smith; *Protaminobacter alboflavum* den Dooren de Jong; *Mycoplana bullata* Gray et Thornton; *Micrococcus piltonensis* Gray et Thornton; *Staphylococcus aureus* Rosenbach; *Sarcina lutea* Schroeter; *Streptococcus pyogenes* Rosenbach; *Escherichia coli* Migula; *Aërobacter aërogenes* Beijerinck; *Serratia marcescens* Bizio; *Proteus vulgaris* Hauser; *Bacterium mycoides* Migula; *Bacillus megatherium* De Bary; *Pseudomonas pictorum* Gray et Thornton; *Bacillus subtilis* Cohn; *Bacillus tumescens* Zopf; *Bacillus closteroides* Gray et Thornton; *Corynebacterium xerose* Neisser et Kuschbert; *Corynebacterium pseudodiphthericum* Lehmann et Neumann; *Mycobacterium lacticola* Lehmann et Neumann; *Mycobacterium phlei* Lehmann et Neumann; *Proactinomyces agrestis* Gray et Thornton; *Proactinomyces minimus* Jensen; *Proactinomyces polychromogenes* Valée; *Proactinomyces crystallophagus* Gray et Thornton; *Proactinomyces rubropertinctus* Heffernan; *Proactinomyces coeliacus* Gray et Thornton; *Proactinomyces actinomorphus* Gray et Thornton; *Proactinomyces erythropolis* Gray et Thornton; *Proactinomyces globerulus* Gray; *Proactinomyces paraffinae* Jensen.

Aucune de ces souches, à l'exception des espèces de *Proactinomyces* et de *Mycobacterium lacticola*, n'a présenté la faculté d'utiliser le cholestérol comme source d'énergie, bien que l'on ait pu observer au cours de nombreuses subcultures la multiplication de plusieurs microorganismes (et tout particulièrement de *P. aeruginosa, P. vulgaris, A. aërogenes, Alc. faecalis*).

Les espèces sûrement actives sur le cholestérol seraient donc seulement les celles qui appartiennent au genre *Mycobacterium: Mycobacterium lacticola, Mycobacterium berolinense* et une souche particulièrement active de *Mycobacterium cholesterolicum*, isolée par TAK par des cultures d'agrandissement avec cholestérol comme source unique de carbone. *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium salmonicolor*, souches de collection de l'Institut de Microbiologie de Delft, étudiées elles aussi par TAK, en employant un milieu de culture ayant le cholésterol comme source unique de carbone. *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium tuberculosis*, contrôlés par SOBEL et PLAUT, le premier au cours de recherches sur le chimisme de la dégradation du cholestérol et le second en déterminant le pouvoir d'utilisation du cholestérol. Un *Azotobacter* d'espèce non déterminée, employé par HORVATH et KRÄMLI. *Flavobacterium maris* Harrison, employé par ARNAUDI et COLLA pour l'oxydation du cholésterol. Cette espèce a été choisie dans un groupe de flavobactéries se multipliant dans les milieux de culture ayant le cholestérol comme source unique de carbone.

Proactinomyces

Le genre *Proactinomyces* comprend des formes microbiennes filamenteuses, pourvues de traces de ramification. Elles peuvent être considérées comme des formes intermédiaires entre les mycobactéries non ramifiées et les actinomycètes abondamment ramifiés. Après avoir exécuté de nombreuses séries de cultures par agrandissement en présence de cholestérol, TURFITT a pu isoler du sol 144 souches de *Proactinomyces erythropolis*, 21 souches de *Proactinomyces aquosus* n. sp., 14 souches de *Proactinomyces globerulus*, 8 souches de *Proactinomyces coeliacus*, 1 souche de *Proactinomyces restrictus* n. sp. Il a été aussi possible à cet auteur d'établir que des souches de collection de *Proactinomyces agrestis, Proactinomyces crystallophagus, Proactinomyces convolutus, Proactinomyces actinomorphus, Proactinomyces minimus, Proactinomyces rubropertinctus, Proactinomyces polychromogenes* peuvent métaboliser le cholestérol et que *Proactinomyces erythropolis* déploie une activité oxydante sur le cholesténone, sur l'œstradiol et sur l'acide cholique.

SCHATZ, SAVARD et PINTER sont d'opinion que d'autres schizomycètes, appartenant à différents genres, peuvent être capables de métaboliser le cholestérol. Il est en effet possible que d'autres schizomycètes puissent intervenir dans ce processus. Les résultats de nos dernières recherches, encore en cours d'élaboration, exécutées au moyen de cultures par agrandissement ensemencées avec de la substance fécale, nous portent à admettre qu'en effet d'autres espèces de schizomycètes sont douées de pouvoir oxydant sur les stéroïdes.

Il nous paraît toutefois un peu simpliste de déduire cette activité biochimique simplement des variations du p_H observées dans des cultures obtenues avec des milieux nutritifs de composition très complexe (comme cela semble avoir été le cas dans les expériences faites par les auteurs que nous venons de citer).

Dégradation du cholestérol et produits de l'oxydation

Le critérium permettant de suivre le processus de dégradation du cholestérol dans sa forme la plus simple nous est fourni par le développement des microbes observés dans des milieux de culture ayant le cholestérol comme source unique de carbone. Cette méthode a été adoptée à titre d'essai par tous les chercheurs et elle est considérée par SOEHNGEN comme le seul test de l'activité des mycobactéries. Ce critérium est toutefois très aléatoire puisque même des traces d'impuretés dans le cholestérol ou bien dans les autres substances contenues dans le milieu de culture peuvent aisément permettre un développement microbien parfois même très abondant, tout particulièrement lorsqu'il s'agit

de mycobactéries saprophytes ayant, comme on sait, des exigences nutritives très limitées.

TAK a suivi ce critérium, en le complétant toutefois par la détermination de la quantité de cholestérol disparue. Dans des cultures par agrandissement, maintenues en agitation pendant 28 jours à 30°C., la quantité résiduelle de cholestérol était entre 3 et 9% de la quantité mise en œuvre, à une concentration de 3 pour 1000 dans le milieu employé.

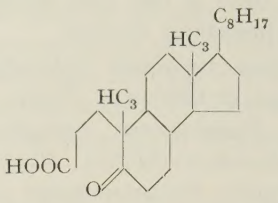
Tous les autres chercheurs ont essayé d'isoler les produits de l'oxydation pour établir un bilan de la dégradation du cholestérol opérée par les microorganismes. Dans ce but ils se sont inspirés, bien entendu, des résultats qu'on obtient au cours de l'oxydation chimique, pendant laquelle la molécule du cholestérol donne lieu à la formation de plusieurs substances, dont la constitution démontre une corrélation étroite entre les stéroïdes, les hormones sexuelles et les acides biliaires.

Il semble que ces dégradations, impliquant la rupture de la chaîne latérale et des transformations dans le noyau polycyclique, sont accompagnées assez fréquemment de changements au C_7. Cela a été démontré par BERGSTROEM et WINTERSTEINER[1] qui, après une aération prolongée de solutions colloïdales de cholestérol stabilisé avec du stéarate de sodium au 3 pour 1000, tenues à 85°C., ont obtenu la formation du 7-hydroxy- et du 7-céto-dérivé.

TURFITT, HORVATH et KRÄMLI, ARNAUDI et COLLA, SOBEL et PLAUT ont essayé la séparation des produits de l'oxydation du cholestérol (et aussi de ses dérivés) et leur identification. En ce qui concerne les méthodes d'isolement et d'identification de ces composés, nous renvoyons le lecteur aux mémoires originaux. Il faut rappeler aussi que dans notre revue nous n'envisagerons que les substances identifiées avec certitude.

Il en résulte que le cholestérol peut être sûrement oxydé en Δ^4 cholesténone par plusieurs *Proactinomyces* et tout particulièrement par *Proactinomyces erythropolis* (TURFITT) et par *Flavobacterium maris* (ARNAUDI et COLLA). Des traces de Δ^4-cholesténone ont été identifiées aussi par SOBEL et PLAUT, qui ont employé le *Mycobacterium smegmatis*. La même substance ainsi que du 7-oxycholestérol ont été obtenus par KRÄMLI et HORVATH avec *Proactinomyces roseus;* avec *Azotobacter* sp. Ces auteurs auraient obtenu du 7-oxycholestérol en même temps que des traces de méthylheptanone. Ce dernier résultat nous laisse toutefois un peu perplexe, puisque la présence de cette substance signifierait la scission de la chaîne latérale et il est improbable que ce fait se soit produit sans qu'une partie au moins du noyau polycyclique ait pu être retrouvée.

TURFITT a soumis à l'oxydation par *Proactinomyces erythropolis* aussi le cholesténone et a pu retrouver et identifier des traces d'un acide cétonique précédemment décrit par WINDAUS[1], qui a la formule suivante:



Le même auteur a essayé aussi d'obtenir l'oxydation de l'œstradiol avec *Proactinomyces*, toutefois l'œstrone s'est formé en quantité très limitée et seulement en présence de grandes quantités de germes.

Quelques dérivés du cholestérol ont été soumis à la même étude.

TURFITT (1948) a essayé l'oxydation de l'acétate de cholestérol avec *Proactinomyces erythropolis*, mais après trois mois d'incubation il a récupéré 18,9 g sur les 20 mis en réaction et 10 mg d'acide isocaproïque. Ce fait pourrait indiquer qu'une oxydation de la chaîne latérale a eu lieu. SOBEL et PLAUT ont observé que *Mycobacterium smegmatis* utilise le succinate de cholestérol, mais en ce qui concerne les produits de l'oxydation, les résultats obtenus par ces auteurs ont été très incertains. Ils ont borné leurs essais à la division de la substance soluble dans l'éther dans les fractions suivantes: alcoolique cétonique; alcoolique non cétonique; non alcoolique non cétonique; non alcoolique cétonique et soluble dans les alcali (voir formule page 87).

Modalités des oxydations

TAK a adopté la méthode des cultures par agrandissement dans des liquides minéraux de culture, auxquels il a ajouté du cholestérol. Les ballons en incubation ont été soumis à une agitation continue. Les subcultures successives ont subi le même traitement. Le cholestérol était introduit de la manière suivante: 1,25 g de cholestérol étaient dissous dans 60 cm^3 d'acétone et le tout égoutté lentement dans 250 cm^3 d'une solution chaude de $(NH_4)_2SO_4$ et de KH_2PO_4 toutes deux à 1 pour 1000. On maintenait le liquide à température d'ébullition jusqu'à complète disparition de l'acétone.

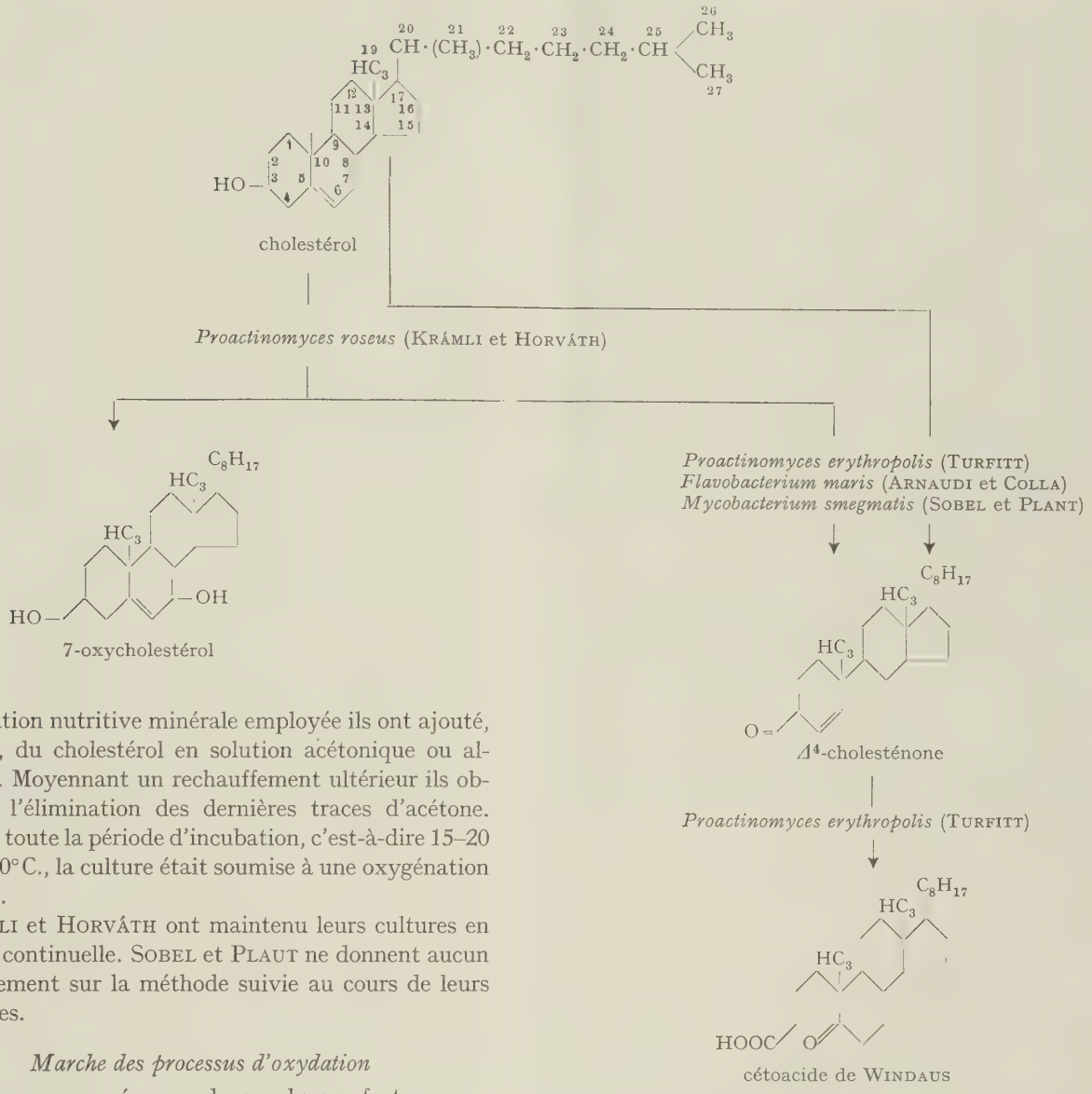
Au cours d'autres essais, on a ajouté au liquide de culture $MgSo_4$, $CaCl_2$ et $Fe_2(SO_4)_3$. Même simplement pulvérisé dans un mortier, le cholestérol ajouté à la solution nutritive minérale était métabolisé aisément par les mycobactéries étudiées par TAK.

Une technique analogue est celle choisie par TURFITT pour une grande partie de ses expériences. Au cours d'autres essais cet auteur a adopté au contraire un système de ballons reliés entre eux à fin de permettre une oxygénation continue et l'éloignement des produits de dégradation.

ARNAUDI et COLLA ont employé des ballons de KLUYVER de forme conique, pourvus d'une cloison poreuse.

[1] S. BERGSTROEM et O. WINTERSTEINER, J. biol. Chem. *141*, 597 (1941).

[1] A. WINDAUS, Ber. dtsch. chem. Ges. *39*, 2008 (1906).



A la solution nutritive minérale employée ils ont ajouté, à chaud, du cholestérol en solution acétonique ou alcoolique. Moyennant un rechauffement ultérieur ils obtenaient l'élimination des dernières traces d'acétone. Pendant toute la période d'incubation, c'est-à-dire 15–20 jours à 30° C., la culture était soumise à une oxygénation continue.

Krámli et Horváth ont maintenu leurs cultures en aération continuelle. Sobel et Plaut ne donnent aucun renseignement sur la méthode suivie au cours de leurs recherches.

Marche des processus d'oxydation

L'influence exercée par de nombreux facteurs extérieurs se montre évidente dans les recherches des auteurs que nous venons de citer. On entrevoit en même temps la possibilité que d'autres facteurs puissent intervenir. Le facteur temps est d'une importance prédominante, soit dans la multiplication des microbes; celle-ci est, comme on sait, assez lente chez les mycobactéries et *Proactinomyces*. Il en est de même de la transformation enzymatique, laquelle est assez lente et n'a lieu qu'en présence d'une flore microbienne abondante. En général les oxydations déterminées par les mycobactéries durent 30 jours (Tak) ou même 3–4 mois (Sobel et Plaut); celles dues à *Proactinomyces* (Turfitt) s'effectuent en 3–5 mois. L'oxydation provoquée par *Flavobacterium maris* (Arnaudi et Colla) est beaucoup moins lente, ayant lieu en 15–20 jours; encore plus rapide est celle d'*Azotobacter* (Horvath et Krämli), qui est terminée au 14e jour.

C'est tout particulièrement chez les *Proactinomyces* qu'une importance notable doit être à l'influence de la concentration des ions hydrogènes. Celle-ci ne doit pas être trop éloignée du point neutre, sinon le développement des microorganismes serait compromis. Si l'on utilise l'ion NH_4^+ sous forme de $(NH_4)_2SO_4$ dans les milieux de culture minéraux, on observe la libération d'ions acides, l'acidification progressive du milieu, et l'arrêt rapide de la multiplication et de l'activité des microorganismes. Il est par conséquent indispensable de tamponner le milieu avec du $CaCO_3$. Il n'a pas été démontré toutefois que le p_H puisse influencer aussi le processus purement enzymatique de l'oxydation.

L'un des aspects les plus intéressants de l'influence exercée par les facteurs externes sur l'oxydation est fourni par la composition chimique du milieu de culture.

Les oxydations ont été obtenues en général avec des liquides de culture purement minéraux; parfois, on a tout de même employé du bouillon de levure ou une solution minérale enrichie en certaines substances organiques complexes. La marche des processus s'en

trouve alors modifiée, très probablement à cause des variations que le patrimoine enzymatique des microorganismes peut subir.

L'influence que le milieu de culture exerce sur l'oxydation a été mise en évidence par Turfitt (1944), qui a constaté que la quantité de cholestérol utilisée par *Proactinomyces erythropolis* dans un milieu de culture contenant de l'azote sous forme de KNO_3 est double de celle qui est métabolisée en présence de NH_4 NO_3 et à peu près triple, lorsqu'on y ajoute en outre du $CaCO_3$ dans la proportion de 0,5%.

Sobel et Plaut d'autre part, ont observé l'influence directe exercée par les substances pouvant alimenter le *Mycobacterium smegmatis* et aussi par les facteurs de croissance. Cette bactérie possède une capacité très limitée de dégradation et d'utilisation du cholestérol, en l'absence d'autres substances organiques, tandis qu'en présence de bouillon de cœur, la dégradation est plus active. Une influence semblable, bien que moins nette, est exercée par la cystine et la glycine. En effet: en présence d'une infusion de cœur (0,3 pour 1000 dans le liquide de culture minéral) la diminution du cholestérol observée au bout de trois mois est à peu près de 30 à 70%, tandis qu'en présence de cystine et de glycine, on obtient la disparition, pendant la même période de temps, du 20–30% du cholestérol. Pour les expériences témoins, avec cholestérol et sans adjonction d'autres substances organiques, la dégradation observée se borne au 5–10%.

Dans notre Institut, nous avons étudié l'influence que le milieu de culture exerce sur la marche de la transformation du cholestérol en cholesténone, déterminée par *Flavobacterium maris*.

Mes collaboratrices, Mme Treccani-Benetti et Mlle Schiesser, avaient observé auparavant que *Flavobacterium maris* donne lieu, en solution purement saline, à la disparition du 33% de l'acide salicylique, tandis qu'en présence de petites quantités d'autres sources de carbone (acétate, succinate, lactate de sodium), il métabolise tout l'acide salicylique présent, en le transformant en une substance qui possède des caractères de solubilité rappelant ceux de la substance humique du sol. Au cours d'une étude sur le comportement vis-à-vis du cholestérol du même *Flavobacterium maris* et, en mettant cette substance dans des liquides de culture minéraux, avec ou sans adjonction du 3 pour 1000 d'asparagine, on a observé qu'en présence de cet acide le cholestérol se transforme en cholesténone au bout de 18 jours (avec aération), dans la proportion d'à peu près 14%, avec un résidu de cholestérol inaltéré d'environ 80%.

Au contraire, en solution nutritive minérale pure sans adjonction d'autres sources de carbone, seulement 1,3% est transformé en une substance constituée en majeure partie par du cholesténone; tout le reste est transformé de manière à ne plus présenter les caractéristiques de la structure stéroïde. L'activité biochimique des microorganismes essayés semble donc être influencée très nettement par la composition du milieu nutritif. On observe enfin qu'en milieu pauvre où la source unique de carbone est représentée par le cholestérol, celui-ci est profondément dégradé même dans sa structure stéroïde, aux fins des nécessités nutritives du microorganisme. En présence de sources de carbone d'utilisation plus facile, l'activité des bactéries oxydant les stéroïdes se manifeste au contraire par des actions enzymatiques secondaires, qui s'exercent sur le cholestérol sans en altérer la structure polycyclique. L'activité des bactéries dans les solutions nutritives pauvres semble être certainement très intéressante, puisqu'il s'agit là du problème du mode d'attaque de la molécule complexe des stéroïdes et, avant tout, du détachement de la chaîne latérale. Il resterait maintenant à considérer le facteur oxygénation, qui a sans doute de l'importance pour ce qui concerne la multiplication des bactéries et la réaction enzymatique sur le cholestérol. Les données dont nous disposons sont toutefois limitées à des observations empiriques: on a simplement constaté que la dégradation est accélérée par l'agitation, l'aération et, enfin, par l'oxygénation forcée. Jusqu'à présent, il nous manque des données sur l'oxydation dans des tambours sous pression d'oxygène.

Il est clair que dans le problème de l'oxygénation deux facteurs sont à considérer. L'un d'eux se rapporte à l'accélération d'une réaction qui se produit aussi, bien qu'avec plus de lenteur, tout simplement en secouant les cultures ou en les étendant sur une grande surface. L'autre se rapporte au degré d'oxydation plus ou moins profond d'une substance qu'un microorganisme peut accomplir en dépendance d'un degré variable du potentiel redox.

Nous sommes entrés dans ces considérations[1] en parlant de la validité des espèces *Flavobacterium androstendionicum* et *Flavobacterium carbolinicum* de Molina et Ercoli. Bien qu'une fonction différente des espèces particulières ne soit pas à écarter, il nous semble en effet que la variabilité du pouvoir oxydatif de ces bactéries et de *Flavobacterium dehydrogenans* peut être attribuée éventuellement aux conditions du potentiel redox des systèmes constitués par les liquides de réaction.

La marche de l'oxydation du cholestérol est liée évidemment aussi aux conditions physiologiques des bactéries. Nous en avons déjà parlé au sujet des flavobactéries.

Il nous reste encore à rappeler l'observation de Turfitt sur l'impossibilité d'exalter l'activité oxydative des *Proactinomyces* au moyen de cultures par agrandissement ainsi que la diminution du pouvoir oxydant sous l'influence du milieu de culture employé dans les collections. Six espèces de *Proactinomyces* ont montré, après une longue période de culture en milieu nutritif

[1] C. Arnaudi et C. Colla, Soc. ital. Sc. bio. Milano (1944).

contenant de l'œstradiol comme source unique de carbone, une diminution de leur capacité d'oxyder le cholestérol en cholesténone, diminution de 30% par rapport aux témoins.

L'intérêt des réactions d'oxydation susdites est évident et non seulement pour le microbiologiste: nos connaissances sur le «cycle des stéroïdes» et des substances naturelles analogues en sont enrichies. D'autre part ces mêmes réactions pourraient intervenir aussi au cours de la formation dans le sol de substances de type hormonal pouvant stimuler en quelque façon la vie végétale. Il faut ajouter que les mêmes réactions présentent un intérêt certain en ce qui concerne plusieurs domaines de la biochimie et de la physiologie animale. Le fait de pouvoir utiliser le délicat réactif qu'est le microorganisme, au lieu de l'énergie brute des réactifs chimiques, donne au biochimiste la possibilité d'examiner à fond les processus de transformation des substances organiques. Il dispose par là d'un moyen profondément sélectif. La possibilité d'étendre l'usage de ce réactif biologique aux stéroïdes mêmes, constitue sans doute un avantage appréciable.

Pour le physiologiste, l'intérêt de ces recherches est considérable puisqu'elles permettront peut être de vérifier l'action directe que l'on prête depuis longtemps aux microbes sur l'évolution des stéroïdes dans l'appareil digestif des animaux. Comme le métabolisme des levures a constitué le modèle du métabolisme intermédiaire des hydrates de carbone dans les animaux, il se pourrait que le chimisme de la transformation bactérienne des stéroïdes puisse nous renseigner à l'avenir sur le métabolisme de ces substances dans l'organisme animal.

Summary

The author discusses the opinions set forth by several authors upon the behaviour of bacteria towards steroids. He examines particularly their behaviour in respect to the resistance of cholesterol against attack by microbes and the antibacteric action of many substances having the phenanthrene nucleus in common.

The author describes his experiences in regard to the oxidation of steroids explaining hormonal activity; he reports the most important characteristics of the various bacteria and also the conditions at which oxidation takes place.

Furthermore he describes the most recent knowledges about the oxidative transformation of cholesterol.

Afterwards he examines the functions of many active organisms (*Flavobacterium, Proactinomyces, Mycobacterium*), the modalities of oxidation, the evolution of the process, and the products resulting from oxidation.

At last the author recalls the decisive influence exercised by the chemical composition of the substrate in which cholesterol is suspended upon the process, which can evolve into a complete demolition of the molecule or to a selective oxidation with production of substances that still retain the fundamental structure of steroids.

Le risposte a reclutamento in rapporto alla fisiologia dei nuclei talamici a proiezione diffusa

Di G. Moruzzi[1], Pisa

Per molto tempo gli studiosi della fisiologia del talamo hanno preso in considerazione i soli sistemi a proiezione specifica ed in particolar modo i nuclei talamici che ricevono impulsi dalle grandi vie sensitive e sensoriali e li trasmettono a loro volta ad aree specifiche e ben delimitate della corteccia cerebrale. Accanto a questi sistemi ve ne sono però altri che si proiettano diffusamente a vaste aree della corteccia cerebrale, esercitando su di esse azioni a tipo generalizzato. Solo negli ultimi anni, dopo la scoperta da parte di Morison e Dempsey[2] dei potenziali a reclutamento, la fisiologia ha abbordato lo studio di queste parti del talamo, la cui funzione era del tutto ignota.

[1] Istituto di Fisiologia dell'Università di Pisa, Pisa (Italia).

[2] R.S. Morison e E.W. Dempsey, Amer. J. Physiol. *135*, 281 (1942).

Nel 1942 Morison e Dempsey osservarono che la stimolazione dei nuclei intralaminari del talamo dava origine a risposte bioelettriche corticali che si distinguevano nettamente da quelle ottenute colla stimolazione dei nuclei a proiezione specifica per i seguenti caratteri:

1° Le risposte specifiche si osservano solo nelle corrispondenti aree corticali di proiezione sensitiva o sensoriale (corteccia sensitiva-motrice per le masse talamiche laterali, corteccia acustica o visiva per stimolazione dei corrispondenti corpi genicolati). Le risposte diffuse si osservano invece su gran parte della corteccia cerebrale, pur con la netta prevalenza delle aree rostrali del pallium.

2° Le risposte specifiche si osservano anche per un singolo stimolo elettrico; occorre invece una stimola-

zione iterativa, la cui frequenza ottima oscilla fra 5 e 10/sec, per produrre le risposte diffuse, caratterizzate dal graduale accrescersi dell'ampiezza dei potenziali corticali. Questi raggiungono il loro massimo sviluppo dopo il terzo o quarto stimolo, per meccanismi di facilitazione che portano all'attivazione d'un numero sempre maggiore di neuroni corticali. Il nome di potenziali o risposte «a reclutamento» (*recruiting responses*) deriva appunto da questo fenomeno.

3° Per frequenze di stimolazione superiori a 20/sec non si osservano più risposte a reclutamento; mentre le risposta specifiche seguono ancora il ritmo di stimolazione dei corrispondenti nuclei talamici, pur con notevole riduzione dell'ampiezza dei potenziali, fino a frequenze di 120/sec.

Già fin dal primo loro lavoro Morison e Dempsey[1] avevano avanzato l'ipotesi che i potenziali a reclutamento fossero dovuti alla sincronizzazione di vaste regioni corticali per opera di un centro talamico relativamente ristretto, che estendeva la sua influenza attraverso un sistema di vie e di sinapsi del tutto indipendente dai sistemi di proiezione corticipeta e d'associazione intracorticale fino allora conosciuti.

Questa ipotesi è stata pienamente confermata e la mole di risultati che si è accumulata in questi 8 anni è tale, che occorrerà suddividere le ricerche in diversi gruppi perchè la nostra esposizione non perda troppo in chiarezza.

I sistemi talamici che producono le risposte a reclutamento. – In una recente rassegna, Rose e Woolsey[2] propongono una classificazione embriologica dei nuclei talamici in tre grandi gruppi, a seconda cioè se essi derivano dall'epitalamo, dal talamo dorsale o dal talamo ventrale. I nuclei d'origine epitalamica non degenerano dopo ablazione di tutto il telencefalo e non hanno quindi rapporti col pallium. I sistemi originati dal talamo dorsale sono invece caratterizzati dal fatto che ognuno di essi si proietta ad un area ristretta e ben delimitata della corteccia cerebrale. Sono pertanto sistemi a proiezione corticale specifica. Essi vengono detti estrinseci, quando ricevono fibre da sorgenti extra-talamiche (lemniscali, acustiche, visive) ed intrinseci se la parte sostanziale delle loro fibre afferenti ha origine nel talamo. I nuclei mediali intralaminari del talamo appartengono appunto ai sistemi intrinseci e si proiettano ad aree ben delimitate della porzione anteriore del rinencefalo. Infine fra i nuclei originati dal talamo ventrale v'è il complesso reticolare, che non degenera nella sua totalità dopo ablazione di aree delimitate della corteccia cerebrale, ma si proietta sulla maggior parte del pallium, embricandosi in tal modo con le aree di proiezione specifica dei nuclei originati dal talamo dorsale.

È chiaro che dal punto di vista anatomico l'unico nucleo talamico a proiezione diffusa è il complesso reticolare, mentre le sole risposte fisiologiche a tipo diffuso finora conosciute – i potenziali a reclutamento – si originano in realtà in nuclei a proiezione specifica. Il primo problema è pertanto quello di risolvere questo contrasto fra anatomia e fisiologia.

Dempsey e Morison[1] hanno dato anzitutto la prova indiscutibile che la generalizzazione alla maggior parte del *pallium* delle risposte a reclutamento non è dovuta a propagazione intra- o intercorticale. Infatti dopo ablazione nel gatto di tutte le regioni corticali anteriori alla scissura soprasilviana, le aree posteriori presentano ancora le risposte a reclutamento. Poichè anche il reciproco è vero e poichè, dopo il completo isolamento d'una ristretta area da tutte le sue connessioni corticali, i potenziali a reclutamento sono in essa presenti, è necessario concludere che l'azione sincronizzante è dovuta all'arrivo diretto alla corteccia cerebrale d'impulsi originati in nuclei talamici a proiezione diffusa. Rose e Woolsey[2] hanno allora suggerito l'ipotesi che i nuclei mediali ed intralaminari del talamo attivino il complesso reticolare, il quale a sua volta recluterebbe i neuroni corticali. Jasper[3] ha proposto di chiamare sistema talamico reticolare l'insieme di nuclei intralaminari e del complesso reticolare. È opportuno tuttavia rilevare che a questa ipotesi, certo soddisfacente allo stato attuale delle nostre conoscenze, manca tuttora il suffragio dell'esperimento.

Meccanismo della propagazione bilaterale della risposta a reclutamento. – La propagazione ad entrambi gli emisferi cerebrali delle risposte a reclutamento non è legata a vie associative intercorticali, essendo presente dopo sezione totale del corpo calloso e delle commissure anteriore e posteriore (Jasper[3]). I seguenti fatti fanno pensare che i nuclei intralaminari stimolati attivino le formazioni talamiche omologhe del lato opposto ed attraverso ad esse, indirettamente, l'emisfero cerebrale controlaterale: 1° la sezione sagittale completa della massa intermedia abolisce il reclutamento controlaterale (Jasper[3]); 2° potenziali a reclutamento si registrano non solo nella corteccia cerebrale ma anche nei nuclei talamici intralaminari, durante la stimolazione delle formazioni omologhe del lato opposto (Moruzzi e Magoun[4]); 3° risposte generalizzate ma unilaterali si osservano stimolando formazioni laterali (centre médian) e anteriori (nucleus reticularis) ai nuclei intralaminari (Jasper[3]) e cioè neuroni che si trovano a valle del primo nella catena plurisinaptica che caratterizza il sistema reticolare.

Sede e meccanismo del reclutamento. – Il tempo latente della risposta a reclutamento è assai lungo, da 20

[1] R. S. Morison e E. W. Dempsey, Amer. J. Physiol. *135*, 281 (1942).

[2] J. E. Rose e C. N. Woolsey, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 391 (1949).

[1] E. W. Dempsey e R. S. Morison, Amer. J. Physiol. *135*, 293 (1942).

[2] J. E. Rose e C. N. Woolsey, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 391 (1949). Bull. Johns Hopkins Hosp. *73*, 65 (1943).

[3] H. Jasper, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 405 (1949).

[4] G. Moruzzi e H. W. Magoun, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).

a 35 msec (Morison e Dempsey[1]), ed in uno stesso preparato può variare notevolmente a seconda delle aree corticali registrate (Jasper[2]). Ciò fa pensare che complessi meccanismi plurisinaptici entrino in giuoco nella trasmissione dell'attività talamica. D'altra parte la lunga durata dei potenziali a reclutamento, che oscilla da 30 a 50 msec (Dempsey e Morison[3], Jasper[2]) ed il loro ampio voltaggio, dell'ordine del millivolta (Dempsey e Morison[3]), dimostrano che la risposta è dovuta alla sincronizzazione delle pulsazioni bioelettriche di numerosi neuroni.

Non v'è dubbio d'altra parte che il progressivo reclutamento di neuroni è legato ad un fenomeno di facilitazione, la cui durata è relativamente grande (dell'ordine di 100 msec). Il problema fondamentale è pertanto quello di localizzare questo fenomeno, cercando di vedere innanzi tutto se il reclutamento avvenga a livello di sinapsi corticali o sottocorticali. A questo fine sono indirizzate le ricerche recenti di Arduini e Terzuolo[4].

Dempsey e Morison[3] avevano già dimostrato che i potenziali a reclutamento erano generalmente negativi, ma che a volte potenziali d'opposta polarità potevano essere registrati simultaneamente su diverse regioni della corteccia cerebrale. Osservazioni analoghe erano state fatte da Jasper[6]. La risposta a reclutamento risultava a volte monofasica (Dempsey e Morison[3]) ed a volte difasica, una piccola onda positiva precedendo in tal caso la grande onda negativa (Jasper[2]). Questa irregolarità di comportamento, in un fenomeno di tale costanza, era rimasta inspiegata. Essa fu il punto di partenza delle ricerche compiute da Arduini e Terzuolo[4] sul gatto cloralosato o senza narcosi («encéphale isolé»), mediante registrazione monopolare dei potenziali bioelettrici del giro sigmoideo, l'elettrodo «indifferente» essendo posto sul bulbo olfattorio termocoagulato.

Questi autori videro innanzi tutto che risposte a reclutamento negative diventavano positive se, asportata la sostanza grigia corticale, si registravano i potenziali bioelettrici della sottostante sostanza bianca; lo stesso risultato veniva ottenuto mediante cocainizzazione locale dell'area corticale ove era stato posto l'elettrodo «differente». Con quest'ultima tecnica era possibile produrre a volontà reclutamenti positivi accanto ai comuni reclutamenti negativi. Diverse prove di controllo dimostrarono, conformemente alla teoria dei conduttori non lineari (Lorente de Nó[6]; Adrian[7]), che le onde positive erano legate all'attività di fibre afferenti talamo-corticali, mentre le onde negative erano dovute all'entrata in giuoco di neuroni corticali. Le onde positive che si registrano a volte dalla corteccia intatta sono probabilmente dovute al fatto che in quella determinata zona le scariche corticipete talamiche non riescono ad attivare i neuroni corticali. Quando questi entrano in giuoco, la corrispondente onda negativa sommerge quella positiva, riducendone l'importanza nelle risposte difasiche e determinandone la quasi totale scomparsa nelle onde monofasiche negative. La minore resistenza all'asfissia dei neuroni corticali rispetto a quelli talamici ha permesso poi ad Arduini e Terzuolo[1] d'invertire più volte, reversibilmente, la polarità di risposte a reclutamento inizialmente negative.

Le risposte che si derivano dalla sostanza bianca sottocorticale assomigliano dunque in modo davvero sorprendente, colla sola eccezione della polarità, a quelle che si derivano dalla superficie della corteccia cerebrale.

Ora Arduini e Terzuolo[1] hanno dimostrato anche per esse la presenza d'un reclutamento e, a volte, del fenomeno della ritmica modulazione dell'ampiezza dei potenziali («waxing and waning») che già era stato osservato registrando nelle identiche condizioni sperimentali le risposte della corteccia cerebrale (Dempsey e Morison[2]; Jasper e Droogleever-Fortuyn[3]; Jasper[4]; Moruzzi, Brookhart, Niemer e Magoun[5]). Ciò dimostra che i centri ove si svolgono i fenomeni di facilitazione che condizionano il reclutamento sono anche sottocorticali; ed altrettanto può dirsi delle ritmiche fluttuazioni d'eccitabilità che producono il «waxing and waning» delle risposte corticali. Il complesso reticolare del talamo appare la localizzazione più probabile di tutti questi fenomeni.

Le risposte a reclutamento e l'interpretazione dell'attività spontanea corticale. – Vi è un insieme veramente imponente di fatti che fa ritenere che i nuclei intralaminari del talamo esercitino un'azione sincronizzante sulla corteccia cerebrale, anche quando essi non vengano direttamente stimolati. Li ricordiamo brevemente.

1° Le aree corticali ove più evidente è il fenomeno del reclutamento coincidono colle aree che più nettamente presentano i fusi spontanei di onde a 8–12/sec, che caratterizzano la narcosi barbiturica (Morison e Dempsey[6]).

2° A volte un solo stimolo applicato ad un area talamica reclutante produce, dopo 100–150 msec, un

[1] A. Arduini e C. Terzuolo, Boll. Soc. It. biol. sper., *26*, 992 (1950).
[2] E.W. Dempsey e R.S. Morison, Amer. J. Physiol. *135*, 293 (1942).
[3] H.H. Jasper e J. Droogleever-Fortuyn, Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis. *26*, 272 (1947).
[4] H. Jasper, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 405 (1949).
[5] G. Moruzzi, J.M. Brookhart, W.T. Niemer e H.W. Magoun, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).
[6] R.S. Morison e E.W. Dempsey, Amer. J. Physiol. *135*, 281 (1942).
[7] E.D. Adrian, J. Physiol. *100*, 159 (1941).

fuso d'onde a 8–12/sec, indistinguibile da quelli che s'osservano spontaneamente (Dempsey e Morison[1]; Jasper[2]).

3° Durante i fusi d'onde a 8–12/sec, l'eccitabilità intrinseca della corteccia cerebrale appare aumentata, come dimostrano esperimenti di stricninizzazione locale o di stimolazione antidromica delle vie piramidali (Moruzzi, Brookhart, Niemer e Magoun[3]). Poichè le fluttuazioni del reclutamento si possono spiegare con ritmiche oscillazioni dell'eccitabilità del sistema reticolare del talamo (Arduini e Terzuolo[4]), è possibile che scariche talamo-corticali provochino i fusi d'onde a 8–12/sec ed aumentino al tempo stesso periodicamente l'eccitabilità corticale. Comunque stiano le cose, le ritmiche oscillazioni del reclutamento (v. sopra) riproducono fedelmente il succedersi di fusi e d'intervalli di silenzio che caratterizzano la narcosi barbiturica o il sonno prodotto la lesioni del sistema attivatore del tronco dell'encefalo (Moruzzi e Magoun[5]; Lindsley, Bowden e Magoun[6]).

4° I potenziali a reclutamento non possono coesistere coi potenziali corticali spontanei che costituiscono i fusi d'onde a 8–12/sec (Dempsey e Morison[7]), il che fa pensare che entrambe le manifestazioni bioelettriche abbiano un substrato anatomico comune. Lo stesso metodo fa ritenere invece che le risposte corticali a stimoli sensitivi o a stimolazione dei nuclei a proiezione specifica utilizzino neuroni corticali diversi da quelli che entrano in giuoco nel fenomeno del reclutamento (Dempsey e Morison[7, 8]; Morison e Dempsey)[9].

Questi dati fanno ritenere che nella narcosi barbiturica o dopo interruzione chirurgica delle vie ascendenti dal sistema attivatore del tronco dell'encefalo, l'apparato reticolare del talamo invii ritmiche scariche d'impulsi alla corteccia cerebrale, sincronizzandone l'attività. Poichè i fusi sono considerati gli omologhi delle onde α nell'uomo, l'importanza dei sistemi talamici a proiezione diffusa per l'elettroencefalografia risulta evidente.

È bene tuttavia stabilire fin d'ora i limiti di queste osservazioni. La tendenza alla sincronizzazione è intrinseca ai neuroni corticali, poichè si osserva (sia pure su scala ridotta) nella corteccia cerebrale isolata (Bremer[10]; Kristiansen e Courtois[11]) e di conseguenza l'azione delle scariche talamo-corticali provenienti dai nuclei a proiezione diffusa è semplicemente quella di facilitare – e non di creare – la sincronizzazione corticale; il fenomeno si osserverebbe, in misura certo assai minore, anche in assenza d'ogni attività talamica. Inoltre, osserva giustamente Bremer[1], non è detto che il sistema talamico reticolare sia il solo apparato diencefalico dotato d'un'azione sincronizzante generalizzata sulla corteccia cerebrale. L'osservazione di Jasper[2] secondo la quale lesioni del nucleus ventralis posterior, sufficienti a sopprimere ogni risposta agli stimoli sensitivi delle corrispondenti aree di proiezione corticale, non aboliscono nè i fusi spontanei nè le risposte a reclutamento, è certo assai dimostrativa. Essa è tra l'altro inconciliabile coll'ipotesi di Dusser de Barenne e McCulloch[3] dei circuiti riverberanti fra corteccia cerebrale e nuclei talamici rispettivi di proiezione specifica. Ma è vero altresì che i fusi spontanei non vengono soppressi neppure dalla lesione dei nuclei mediali talamici e dalla massa intermedia (Lindsley, Bowden e Magoun[4]). Solo ulteriori indagini potranno chiarire queste discordanze, il cui significato però non può essere sottovalutato.

Numerosi problemi abbiamo di proposito esclusi dalla cerchia ristretta di argomenti stabiliti dal titolo della presente trattazione. Ricordiamo i rapporti fra i nuclei talamici a proiezione diffusa e il *petit mal* (Jasper e Drooglever-Fortuyn[5]; Hunter e Jasper[6]; l'azione della stimolazione degli stessi nuclei sul comportamento dell'animale senza narcosi ed il loro rapporto coi centri del sonno di Hess (Hunter e Jasper[6]); cfr. Moruzzi[7]); l'antagonismo tra sistema talamico reticolare e sistema attivatore ascendente del tronco dell'encefalo (Moruzzi e Magoun[4]; Lindsley, Bowden e Magoun[3]); infine gli effetti attivatori prodotti dalla stimolazione ad alta frequenza dei nuclei intralaminari del talamo (Dempsey e Morison[9]; Jasper[10]; Moruzzi e Magoun[8]). Vorremmo solo ricordare, prima di finire, che le risposte a reclutamento sono semplicemente un aspetto particolare dell'attività dei nuclei talamici a proiezione diffusa, quello che si osserva per la loro stimolazione alla frequenza da 5–15/sec. L'azione fisiologica di questi nuclei non si limita però a sincronizzare le pulsazioni bioelettriche dei neuroni corticali, per quanto questo aspetto della loro attività sia forse il più importante durante il sonno.

[1] E.W. Dempsey e R.S. Morison, Amer. J. Physiol. *135*, 293 (1942).
[2] H. Jasper, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 405 (1949).
[3] G. Moruzzi, J.M. Brookhart, W.T. Niemer e H.W. Magoun, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).
[4] A. Arduini e C. Terzuolo, Boll. Soc. It. biol. sper., 1950 (in stampa).
[5] G. Moruzzi e H.W. Magoun, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).
[6] D.B. Lindsley, J.W. Bowden e H.W. Magoun, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 475 (1949).
[7] E.W. Dempsey e R.S. Morison, Amer. J. Phys. *135*, 301 (1942).
[8] E.W. Dempsey e R.S. Morison, Amer. J. Physiol. *138*, 283 (1943).
[9] R.S. Morison e E.W. Dempsey, Amer. J. Physiol. *138*, 297 (1943).
[10] F. Bremer, C. r. Soc. Biol. Paris *127*, 355 (1938); EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 177 (1949).
[11] K. Kristiansen e G. Courtois, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 254 (1949).

[1] F. Bremer, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 177 (1949).
[2] H. Jasper, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 405 (1949).
[3] J.G. Dusser de Barenne e W.G. Mc Culloch, J. Neurophysiol. *1*, 176 (1938).
[4] D.B. Lindsley, J.W. Bowden e H.W. Magoun, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 475 (1949).
[5] H.H. Jasper e J. Drooglever-Fortuyn, Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis. *26*, 272 (1947).
[6] J. Hunter e H.H. Jasper, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 305 (1949).
[7] G. Moruzzi, A review on W.R. Hess' book *Das Zwischenhirn*, J. Neurophysiol. *12*, 357 (1949).
[8] G. Moruzzi e H.W. Magoun, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).
[9] E.W. Dempsey e R.S. Morison, Amer. J. Physiol. *135*, 293 (1942).
[10] H. Jasper, EEG. Clin. Neurophysiol. *1*, 405 (1949).

Zusammenfassung

Das anatomische Substrat der durch rhythmische Reizung der interlaminaren Nuclei des Thalamus hervorgerufenen «Rekrutierung» (recruiting responses) wird beschrieben. Weiterhin wird der Mechanismus der Ausbreitung der kortikalen Synchronisierung in beiden Hemisphären und die subkortikale Lokalisation der hierfür verantwortlichen Synapsen dargelegt. Zum Schluß werden die Beziehungen zwischen den Nuclei des intralaminären Thalamus und der Synchronisierung der bioelektrischen Erscheinungen in den kortikalen Neuronen besprochen.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Steroids XV[1]. The Bromination of 3-Ketosteroids of the Normal Series

The behavior of 3-keto*allo*steroids (rings A/B *trans*) towards mono- or di-bromination (monobromination at C-2; dibromination at 2,2 followed by rearrangement to the 2,4-isomer) has been established unequivocally, principally by investigating the products obtained on collidine dehydrobromination[2]. The dehydrobromination products of such 2,4-dibromo-3-keto*allo*steroids, the 1,4-dien-3-ones (IV), represent the key intermediates for the partial synthesis[3] of estrogenic hormones on an industrial scale.

The bromination of 3-ketosteroids of the normal series (rings A/B cis) (I) has been interpreted[4] as proceeding through a 4-bromo derivative to a 4,4-dibromo compound (II) and hence the steroids of the *normal* series (coprostane, etiocholanes, pregnanes, etc.) were considered unsuitable as starting materials for the synthesis of the estrogens[5]. Butenandt[6] postulated that monobromination of *normal* steroids such as coprostanone (Ia) results exclusively in substitution at C-4, because pyridine dehydrobromination leads to Δ^4-3-ketosteroids. However, the poor yields in the latter reaction do not exclude the presence of some 2-bromo derivative, particularly since pyrolysis of 2-bromosteroidal pyridinium salts is known to yield Δ^4-3-ketones[1]. The recently described[2] dehydrobromination of mono-bromo *normal* ketones to the Δ^4-3-ketosteroids in nearly quantitative yield lends considerable support to Butenandt's formulation[3], but at the same time it has also been demonstrated[4] that some substitution occurs simultaneously at C-2 during the bromination. As is to be expected on mechanistic grounds, bromination should follow the same course as sulfonation and the work of Windaus[5] on the sulfonation of coprostanone at C-4 *and C-2* supports the belief, contrary to statements in the literature[6], that substitution at C-2 in steroids of the *normal* series (I) is possible. Since the 4,4-dibromo formulation (II)[7] rests primarily on evidence (reaction with *o*-phenylenediamine, potassium benzoate etc.) which is notoriously unreliable because of facile rearrangements, we have investigated the reaction of dibromo-3-keto*normal* steroids with collidine. The recent report of Inhoffen[8] prompts us to communicate our results at this time.

Dibromocoprostanone[7] (90% yield in acetic acid; melting point 136–137°, $[\alpha]_D^{20} + 10°$) exhibits an infrared band[9] at 1756 cm^{-1} typical of 2,4-dibromo-3-ketoallosteroids[10] (gem-dibromo derivatives, such as 2,2-dibromo-3-ketones, possess one at 1739 cm^{-1}). Collidine dehydrobromination (1·6–1·8 moles collidine hydrobromide isolated), followed by chromatography and spectrophotometric analysis of the chromatogram

[1] Steroids XIV: O. Mancera, G. Rosenkranz, and C. Djerassi, J. Org. Chem. (in press).

[2] H. H. Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein. – C. Djerassi and C. R. Scholz, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 2404 (1947); J. Org. Chem. *13*, 697 (1948).

[3] H. H. Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein. – A. L. Wilds and C. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 2125 (1946). – C. Djerassi and C. R. Scholz, *ibid. 71*, 3962 (1949). – E. B. Hershberg, M. Rubin, and E. Schwenk, J. Org. Chem. *15*, 292 (1950).

[4] A. Butenandt *et al.*, Ber. Dtsch. chem. Ges. *69*, 2779 (1936). – L. Ruzicka *et al.*, Helv. chim. acta *19*, 1147 (1936). – H. H. Inhoffen, G. Stoeck, and I. U. Nebel, Ann. Chemie *563*, 135 (1949). On the basis of the present results Inhoffen's diketone of melting point 116–117° is most likely coprostane-2,3-dione.

[5] H. H. Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein. – H. H. Inhoffen and G. Stoeck, Exper. *4*, 426 (1948).

[6] A. Butenandt and A. Wolff, Ber. Dtsch. chem. Ges. *68*, 2091 (1935) and later papers.

[1] L. Ruzicka, Pl. Plattner and R. Aeschbacher, Helv. chim. acta, *21*, 866 (1938).

[2] V. R. Mattox and E. C. Kendall, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 882 (1948). – C. Djerassi *ibid.*, *71*, 1003 (1949).

[3] A. Butenandt and A. Wolff, Ber. Dtsch. chem. Ges. *68*, 2091 (1935) and later papers.

[4] V. R. Mattox and E. C. Kendall, J. Biol. Chem. *185*, 593 (1950).

[5] A. Windaus *et al.*, Ann. Chemie *532*, 52 (1937); *ibid. 536*, 116 (1938).

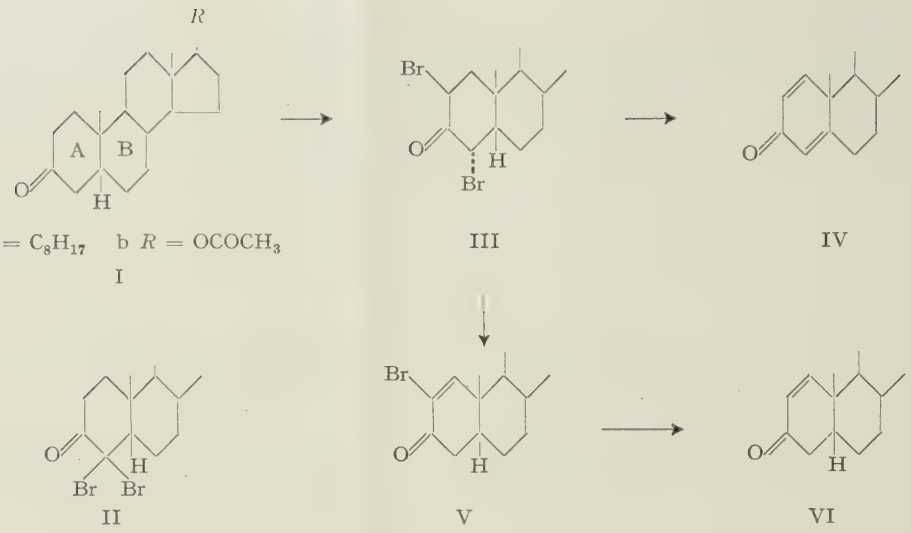
[6] H. H. Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein.

[7] A. Butenandt *et al.*, Ber. Dtsch. chem. Ges. *69*, 2779 (1936). – L. Ruzicka *et al.*, Helv. chim. acta *19*, 1147 (1936). – H. H. Inhoffen, G. Stoeck, and I. U. Nebel, Ann. Chemie *563*, 135 (1949).

[8] H. H. Inhoffen *et al.*, Chem. Z. *74*, 309 (1950).

[9] Kindly carried out by Dr. K. Dobriner, Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York City.

[10] R. N. Jones, P. Humphries, and K. Dobriner, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 956 (1950).



a $R = C_8H_{17}$ b $R = OCOCH_3$ I

III IV

II V VI

fractions[1] yielded *ca.* 25% of 1,4-cholestadien-3-one (IVa)[2] and 8% of a *substance*, $C_{27}H_{43}OBr$ (found: C, 70·26; H, 9·31; Br, 17·24), with melting point 133·5–135·5°, $[\alpha]_D^{20} + 53°$ (chloroform), u.v. maximum at 256 mμ (log ε 3·87), infrared band[3] at 1697 cm^{-1}. The absorption spectra are fully consistent with the formulation V, Δ^1-2-bromocoprosten-3-one, a C-5 diastereoisomer of Δ^1-2-bromocholesten-3-one[4], which exhibits maxima at 256 mμ and 1697 cm^{-1} [5]. Debromination with zinc in ethanol afforded Δ^1-coprosten-3-one (VIa), $C_{27}H_{44}O$ (found: C, 84·00; H, 11·25), melting point 101°, u.v. maximum at 230 mμ (log ε 4·01), infrared band at 1685 cm^{-1}. The physical constants of this substance are again in concordance with the spectral results observed for the isomeric Δ^1-3-ketoallosteroids[6]. Similarly, dibromination of etiocholanolone acetate (Ib) in acetic acid led in nearly quantitative yield to dibromoetiocholan-17β-ol-3-one-17-acetate[7], $C_{21}H_{30}O_3Br_2$ (found: C, 51·32; H, 6·23; Br, 32·49) with melting point 204–205°, $[\alpha]_D^{20} + 8°$ (chloroform), infrared bands at 1739 cm^{-1} (acetate) and 1756 cm^{-1}, which on dehydrobromination with collidine (1·7 moles of collidine hydrobromide isolated) gave 9% of Δ^1-2-bromoetiocholen-17β-ol-3-one 17-acetate, (Vb) $C_{21}H_{29}O_3Br$ (found: C, 61·81; H, 7·31) with melting point 223–225°, $[\alpha]_D^{20} +$ 80° (chloroform), u.v. maximum at 256 mμ (log ε 4·05) and 34% of 1,4-androstadien-17β-ol-3-one 17-acetate (IVb), melting point 149–151°[8], identified after saponification by direct comparison with an authentic sample of 1,4-androstadien-17β-ol-3-one[9], melting point 167 to 169°, and by dienone-phenol rearrangement to the known aromatic phenols[1]. The formation of 1,4-dien-3-ones (IV) from 3-keto*normal*steroids (I) thus makes possible the direct synthesis of the female sex hormones from this important class of steroids, a reaction which has previously been carried out only indirectly[2] via the intermediate Δ^4-3-ketosteroids.

While it is not possible with absolute certainty to exclude the earlier 4,4-dibromo structure (II)[3], since hypothetical rearrangement products could be postulated to account for the formation of the dehydrobromination products, the present evidence coupled with the infrared results strongly suggests[4] that the dibromination products of the normal series are the 2,4-dibromo-3-ketones (III). The same conclusion has been put forward by Gallagher *et al.*[5], on the basis of infrared spectra and by Inhoffen[6] on account of the isolation of 1,4-dien-3-ones (IV) by collidine dehydrobromination similar to the one described in this communication. The present isolation in poor yield of the previously unknown Δ^1-2-bromo-3-keto*normal* steroids (V) can be rationalized by either assuming the presence of a small amount of 2,2-dibromo-3-ketone in the original dibromo ketone or an *in situ* rearrangement to such a structure in the collidine reaction. As we have already demonstrated in the case of Δ^4-3-ketosteroids[2], contrary to earlier assumption[7], substitution can occur at C-2 in 3-keto-

[1] A.L.Wilds and C.Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 1712 (1946).

[2] H.H.Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein. – A.L.Wilds and C.Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 1712 (1946).

[3] Kindly carried out by Dr. K. Dobriner, Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York City.

[4] C.Djerassi and C.R.Scholz, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 2404 (1947).

[5] H.H.Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein. – C.Djerassi and C.R.Scholz, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 2404 (1947); J. Org. Chem. *13*, 697 (1948). – R.N.Jones, P. Humphries, and K.Dobriner, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 956 (1950).

[6] See Note 10, page 93, right column.

[7] B.A.Koechlin, T.H.Kritchevsky, and T.F.Gallagher, J. Biol. Chem. *184*, 393 (1950) recently isolated this compound in an impure state as a byproduct in the monobromination of Ib.

[8] H.H.Inhoffen, G.Zuehlsdorff, and Huang Minlon, Ber. Dtsch. chem. Ges. *73*, 451 (1940).

[9] A.L.Wilds and C.Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 2125 (1946).

[1] H.H.Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein. – A.L.Wilds and C.Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 2125 (1946). – Cf. C.Djerassi, G. Rosenkranz, J. Romo, J. Pataki, and St. Kaufmann, *ibid.* *72*, 4540 (1950).

[2] G.Rosenkranz, C.Djerassi, St.Kaufmann, J.Pataki, and J.Romo, Nature *165*, 814 (1950). – C.Djerassi, G. Rosenkranz, J. Romo, St. Kaufmann, and J. Pataki, J. Amer. Chem. Soc., *72*, 4534 (1950).

[3] A.Butenandt *et al.*, Ber. Dtsch. chem. Ges. *69*, 2779 (1936). – L.Ruzicka *et al.*, Helv. chim. acta *19*, 1147 (1936). – H.H.Inhoffen, G.Stoeck, and I.U.Nebel, Ann. Chemie *563*, 135 (1949).

[4] It should be remembered that the infrared values obtained earlier (R. N. Jones et al., loc. cit.) refer to the *allo* series and that the present deductions based on these values represent circumstantial but not conclusive evidence.

[5] B. A. Koechlin, T. H. Kritchevsky, and T. F. Gallagher. J. Biol. Chem. *184*, 393 (1950).

[6] H. H. Inhoffen *et al.*, Chem. Z. *74*, 309 (1950).

[7] H.H.Inhoffen, Angew. Chem. *59*, 207 (1947) and references cited therein.

steroids regardless of the steric configuration of the A/B ring juncture.

Carl Djerassi and G. Rosenkranz

Research Laboratories, Syntex, S.A., Laguna Mayran 413, Mexico City, D.F., August 9, 1950.

Zusammenfassung

Die Bromwasserstoffabspaltung aus den bisher als 4,4-Dibrom-Verbindungen aufgefaßten *normalen* Dibrom-3-ketosteroiden führt zur Bildung von 1,4-Dien-3-onen (IV), welche bisher nur aus 2,4-Dibrom-3-keto*allo*steroiden erhalten worden waren. Daneben entstehen kleine Mengen von Δ^1-2-Brom-3-keto*normal*-steroiden (V). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die überdies durch UV- und Infrarotspektren gestützt sind, machen es äußerst wahrscheinlich, daß die Dibromierung der *normalen* 3-Ketosteroide in 2,4-Stellung erfolgt. Die in dieser Arbeit beschriebene Herstellung von 1,4-Dien-3-onen (IV) der Steroid-Reihe erweist sich somit als eine zweite Methode[1] zur partiellen Synthese östrogener Hormone, ausgehend von Steroiden der *normalen* Serie.

[1] G. Rosenkranz, C. Djerassi, St. Kaufmann, J. Pataki, and J. Romo, Nature *165*, 814 (1950). – C. Djerassi, G. Rosenkranz, J. Romo, St. Kaufmann und J. Pataki, J. Amer. Chem. Soc., *72*, 4534 (1950).

The Action of *t*-Butyl Hypochlorite on 1-Methyl-4-isopropyl-3-cyclohexene [*p*-Menthene-(3)]

For the reaction of α-pinene with *t*-butyl hypochlorite, Ritter and Ginsburg[1] have proposed a mechanism which involves addition of the reagent to the double bond and subsequent elimination of *t*-butanol. This mechanism suggested a number of interesting synthetic possibilities in the terpene series.

Table I

Compound	b.p.	n_D^{25}	d_{25}	$(\alpha)_D^{25}$
Menthenyl chloride A	90–94°/12 mm	1·4982[1]	1·033[2]	–0·74°
Menthenyl chloride B	102–105°/12 mm	1·4934[1]	0·955[2]	–0·69°
Menthenol A. . . .	105°/36 mm	1·4719	0·913	–4·52°
Menthenol B. . . .	95°/36 mm	1·4650	0·930	–1·06°
Menthenone A . . .	95–100°/23 mm	1·4864	0·935	
Menthenone B . . .	105–110°/23 mm	1·4798	0·941	

[1] n_D^{20}; [2] d_{20}

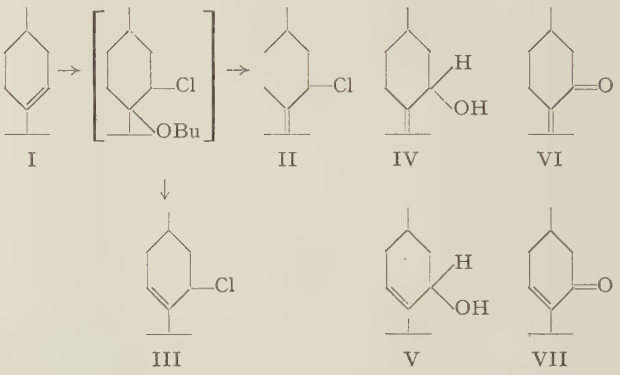
Table II

Dinitrophenylhydrazone	λmax calculated	λmax found	εmax found
Menthenone A (VI) . .	3860	3860	18,800
Menthenone B (VII) . .	3810	3820	30,800

[1] J. J. Ritter and D. Ginsburg, J. Amer. Chem. Soc., *72*, 2381 (1950).

From *p*-menthene-(3) (I), two isomeric chloromenthenes were obtained, which were separated by fractional distillation. Both of them were *secondary* chlorocompounds, as both corresponding alcohols (obtained by alkaline hydrolysis, and purified through the benzoates) could be oxidised to *ketones* by Oppenauer's method. The physical constants of the substances isolated are summarized in Table I.

Both ketones were *α, β-unsaturated*, as the colour and the absorption spectrum of their 2,4-dinitrophenylhydrazones indicated. Using the data reported by Braude and Jones[1], even more definite conclusions can be drawn, as to the *structure* of these unsaturated ketones, from the exact location of the ultraviolet absorption maxima and their extinction coefficients: both are dependent on the degree of substitution of the absorbing system C=C–C=N. From the data in Table II, it can be concluded that one of the dinitrophenylhydrazones belongs to the type $R_2C{=}CR{\cdot}CR{=}N$, the other to the type $R{\cdot}CH{=}CR{\cdot}CR{=}N$. The former could, therefore, be *pulegone* (VI), the latter *1-methyl-4-isopropyl-4-cyclohexen-3-one* (VII); their formation would be easily understood from the following reaction scheme:



As, however, no data are available regarding the spectral properties of the dinitrophenylhydrazones of these ketones, especially of the—somewhat unusual—type (VI), further evidence is being sought by conventional, chemical methods.

David Ginsburg

Daniel Sieff Research Institute, Weizmann Institute of Science, Rehovoth, Israel, August 27, 1950.

Résumé

Les formules (II) et (III) sont proposées pour deux chlorures secondaires obtenus par l'action de l'hypochlorite de butyl tertiaire sur le *p*-menthène-(3) (I). La transformation de ces chlorures en deux cétones α, β-nonsaturées, par hydrolyse et déhydrogénation, confirme ces formules.

[1] E. A. Braude and E. R. H. Jones, J. Chem. Soc., 498 (1945).

Etude de la molécule d'acide thymonucléique par des mesures de biréfringence d'écoulement dans des solvants de viscosité variable[1]

On admet généralement qu'une molécule en chaîne peut affecter suivant sa structure chimique et suivant la nature du solvant, des formes très variables, depuis le bâtonnet quasi-rigide jusqu'au peloton souple et recro-

[1] Une publication détaillée paraîtra dans un autre recueil.

quevillé. Des expériences de biréfringence d'écoulement permettant de mettre en évidence ces différences de structure ont été décrites récemment par l'un de nous[1]. Soit $(\mathrm{tg}\ \alpha)_0$ la valeur extrapolée à concentration nulle de $\mathrm{tg}\ \alpha$, pente de la tangente au départ de la courbe $\varphi(G)$ donnant la position des lignes neutres de la solution en écoulement en fonction du gradient de vitesse G de l'écoulement. Il s'agit de mesurer $(\mathrm{tg}\ \alpha)_0$ pour les solvants de viscosités différentes. Dans le travail cité, on comparait le comportement des molécules de virus de la mosaïque du tabac (bâtonnets rigides) et celui des molécules de polystyrolène (chaînes pelotonnées). Les variations de viscosité du solvant étaient obtenues en faisant varier la température de l'expérience.

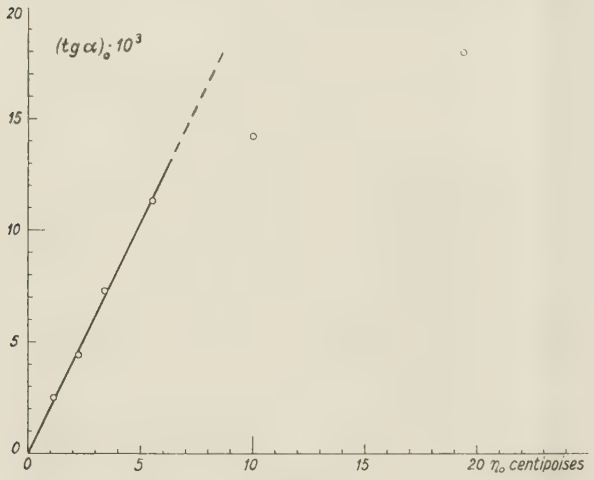


Fig. 1.

Nous avons repris ici ces expériences sur des molécules d'acide thymonucléique[2]. Les variations de la viscosité η_0 ont été réalisées en employant comme solvant un mélange eau avec 10% de ClNa et de glycérine en proportion variable. Nous avons pu ainsi faire varier la viscosité du solvant dans un rapport de 1 à 20.

a) La figure 1 représente en fonction de la viscosité η_0 les valeurs de $(\mathrm{tg}\ \alpha)_0$ pour six concentrations différentes en glycérine. On obtient ainsi une courbe qui, à l'approximation des expériences, passe par l'origine des coordonnées.

Ainsi le comportement de $(\mathrm{tg}\ \alpha)_0$ en fonction de η_0 pour les faibles valeurs de η_0 rappelle-t-il celui que l'on connaît pour la molécule de virus de la mosaïque du tabac[3]. On se souvient que les points expérimentaux se placent dans le cas du virus de la mosaïque du tabac sur une droite passant par l'origine des coordonnées en accord avec la théorie de l'orientation[4], tandis que dans le cas du polystyrolène la courbe, conformément à la théorie de la déformation, possède une ordonnée à l'origine positive.

La courbe obtenue ici présente pour les valeurs élevées de la viscosité η_0 une forte concavité dirigée vers le bas.

b) La figure 2 représente en fonction de η_0 les valeurs de $[(n_\gamma - n_\alpha)/G\,c]_0$, c'est-à-dire les valeurs extrapolées à gradient de vitesse nul et à concentration nulle du rapport $(n_\gamma - n_\alpha)/G\,c$. Pour les faibles valeurs de η_0 la quantité $[(n_\gamma - n_\alpha)/G\,c]_0$ est proportionnelle à η_0, tandis que pour les valeurs élevées de η_0 la courbe montre une faible concavité dirigée vers le bas.

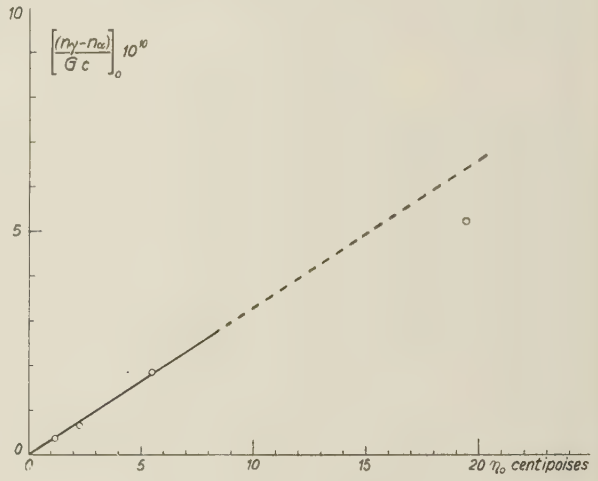


Fig. 2.

C'est pour les faibles valeurs de η_0 que les mesures ainsi que leur interprétation présentent le plus de sécurité. Le résultat *b*) compatible avec la théorie de l'orientation des particules rigides, l'est aussi avec les différentes théories de l'effet Maxwell des solutions de macromolécules en chaînes et ne permet pas de conclure. Il confirme toutefois l'existence d'une anomalie pour les valeurs élevées de η_0.

Le résultat *a*) montre que *la molécule d'acide thymonucléique se comporte ici comme un bâtonnet rigide.*

Ce résultat confirme et précise certaines conclusions de Signer, Caspersson et Hammarsten[1].

Nous tenons à exprimer notre vive reconnaissance à M. le Prof. Ch. Sadron, Directeur du C.E.P.M. L'un de nous (H. Sch.) a bénéficié d'une bourse de la «Schweizerische Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie» qu'il tient à remercier également très vivement.

H. Schwander et R. Cerf

Institut de Chimie de l'Université de Berne et Centre d'Etudes de Physique Macromoléculaire, Faculté des Sciences, Université de Strasbourg, le 10 novembre 1950.

Zusammenfassung

Aus Messungen des Orientierungswinkels bei der Strömungsdoppelbrechung in Lösungen verschiedener Viskosität lassen sich Schlüsse auf die Starrheit der gelösten Makromoleküle ziehen.

Bestimmungen an einem Präparat von Natrium-Thymonukleinat (gelöst im System H_2O–NaCl–Glyzerin) ergaben ein Verhalten, wie es an Lösungen langgestreckter, starrer Teilchen beobachtet wurde.

[1] Siehe Note 4, links unten.

Zur Molekulargewichtsverteilung von Blutersatzpräparaten aus Polyvinylpyrrolidon

Das von Fikentscher und Herrle[1] entwickelte Polyvinylpyrrolidon (Kollidon) hat in den Kriegs- und

[1] R. Cerf, C. r. Acad. Sci. *230*, 81 (1950); J. Chim. Phys *47*, 663 (1950).

[2] Pour la préparation de l'échantillon cf. R. Signer et H. Schwander, Helv. chim. acta *32*, 853 (1949).

[3] Cf. A. Peterlin et H. A. Stuart, Z. Physik *112*, 1 (1939).

[4] R. Signer, T. Caspersson et E. Hammarsten, Nature *141*, 122 (1938).

[1] Bios Final Report No. 354. – H. Fikentscher und K. Herrle, Modern Plastics *23*, 157, 212 (1945). – G. Hecht und H. Weese, Münch. Med. Wschr. *90*, 11 (1943).– E. Klees, Münch. Med. Wschr. *90*, 29 (1943).

Nachkriegsjahren als Blutersatz sowie als Vehikelsubstanz[1] Verwendung gefunden.

Kürzlich haben Ammon und Mitarbeiter[2] gezeigt, daß am Hund und am Kaninchen ein Teil des verabreichten Peristons gespeichert wird und in den Organen histologisch nachweisbare Veränderungen verursacht. Nur etwa 40–60 % des Peristons werden durch den Harn ausgeschieden.

Ammon und Braunschmidt[2] vermuten, daß nur die niedrigmolekularen Anteile des Polyvinylpyrrolidons die Nieren passieren, während die höhermolekularen Anteile vornehmlich in der Milz und in den Lymphknoten abgelagert werden.

Wir haben nun zwei käufliche Injektionslösungen auf ihre Polydispersität hin untersucht, indem wir die Eindampfrückstände nach dem Entsalzen fraktionierten und die Molekulargewichte mit Hilfe von Ultrazentrifugen- und Viskositätsmessungen bestimmten.

Dabei erhielten wir folgende Ergebnisse[3]:

Handelspräparat I		*Handelspräparat II*	
%-Gehalt	Durchschnittsmolekulargewicht	%-Gehalt	Durchschnittsmolekulargewicht
11,8	54000	13,4	76000
13,2	52500	7,8	54000
11,1	35000	11,3	42500
11,1	34000	9,9	28000
15,3	25000	12,7	22500
10,4	19500	8,5	16200
7,0	13200	10,6	12600
4,8	11800	10,6	11000
4,2	8700	2,7	5800
11,1	2700	12,7	5400

Obwohl die Permeabilität der Niere für synthetische Stoffe noch nicht genau bekannt ist[4], scheint uns die von Ammon und Mitarbeitern gegebene Deutung zumindesten für Vinylpolymere in Anbetracht der gefundenen breiten Molekulargewichtsverteilung richtig zu sein.

An der Ratte konnten wir mit Polyvinylalkohol[5] histologisch nachweisen, daß Fraktionen von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 75000 in verschiedenen Organen (Milz, Leber, Niere) reichlicher abgelagert werden als Fraktionen von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 25000.

Da ein Abbau im Organismus unwahrscheinlich und nach den Ergebnissen von Ammon und Braunschmidt[6] auszuschließen ist, kann angenommen werden, daß für die Ausscheidung von Vinylpolymeren die Molekülgröße ausschlaggebend ist.

Über Ablagerungsversuche von definierten Polyvinylalkoholfraktionen soll später an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

K. Dialer, A. Studer und K. Vogler

Wissenschaftliche Laboratorien der Fa. F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, den 15. Dezember 1950.

Summary

The molecular weight distribution of two commercial blood substitutes of the polyvinyl-pyrrolidone type is determined.

The width of this distribution is discussed in relation to excretion experiments.

It is shown by histological methods that fractions of polyvinylalcohol of an average molecular weight of 75,000 are retained in the organs to a greater extent than fractions of an average molecular weight of 25,000.

New Data on the Physico-chemical Properities of Heparin

One of us (Pálos) pointed out that thrombin can be oxidized and becomes in its oxidized form inactive, further that heparin inhibits this oxidation completely in γ-quantities[1].

This hitherto unknown property of heparin induced us to examine the behaviour of heparin (Hoffmann-La Roche) in an oxidizing resp. oxidizing-reducing system. We did not succeed in our past experiments in reactivating the oxidized and thus inactivated thrombin, we made use of the experiments on oxidizing-reducing systems. We chose for our experiments the methylene blue-leukomethylene blue-ascorbic acid-dehydroascorbic acid system and proceeded as follows:

To a solution of methylene blue diluted 1:5000 we added the same quantity of 1 % ascorbic acid solution and by boiling reduced the methylene blue to leukomethylene blue. As in our system the quantity of ascorbic acid was in excess of the quantity of methylene blue the system, besides dehydroascorbic acid, also contained ascorbic acid. The ascorbic acid prevented the immediate oxidation of the leukomethylene blue, and therefore our system remained nearly colourless and contained methylene blue only in traces. When heparin in concentration of varying γ-quantities $\frac{(20–200\,\gamma)}{4–5\,\mathrm{ml}}$ was added to our system the leukomethylene blue underwent oxidation and was reoxidized to methylene blue. The quantity depends on the amount of heparin, whereas the controls without any heparin remained colourless, that is the oxidation of leukomethylene blue did not take place.

We used for measurements Pulfrich's Stufenphotometer.

We had further to clear up whether heparin alters the equilibrium of the leukomethylene blue-dehydroascorbic acid system, whether heparin itself is an oxidizing substance or achieves its effect through transfer of oxygen from other sources. Our experiments proved that heparin does not upset the equilibrium of the leukomethylene blue-dehydroascorbic acid system and is not an oxidizing substance either, but it transfers the oxygen of the air or of any other oxidizing material available, or positive charges, with such vigour that the oxidation of

[1] H. Bennhold und R. Schubert, Klin. Wschr. *23*, 30 (1944). – G. Bergold, Z. Naturforschg. *3b*, 300 (1948). – R. Schubert, Schweiz. Med. Wschr. *80*, 140 (1950); Deutsche Med. Wschr. *73*, 551 (1948); Ärztl. Forschg. *3*, 425 (1949). – W. Kikuth et al., Z. Naturforschg. *3b*, 342 (1948).

[2] R. Ammon und G. Braunschmidt, Biochem. Z. *319*, 370 (1949). – R. Ammon und W. Müller, Dtsch. Med. Wschr. *74*, 465 (1949).

[3] Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse im Zusammenhang mit der Fraktionierung technischer Produkte erscheint in der Zeitschrift «Die makromolekulare Chemie».

[4] A. Grönwall und B. Ingelmann, Acta Physiol. Scand. *9*, 1 (1945). – E. Bayliss et al., J. Physiol. *77*, 386 (1933.)

[5] Für den Ablagerungsversuch wählten wir nicht Polyvinylpyrrolidon, sondern Polyvinylalkohol, weil dieser färberisch in den Geweben nachgewiesen werden kann. – W. C. Hueper, Arch. Path. *34*, 883 (1942); Amer. J. Path. *18*, 895 (1942).

[6] R. Ammon und G. Braunschmidt, Biochem. Z. *319*, 370 (1949). – R. Ammon und W. Müller, Dtsch. Med. Wschr. *74*, 465 (1949)

[1] L. A. Pálos, Exper. *5*, 207 (1949).

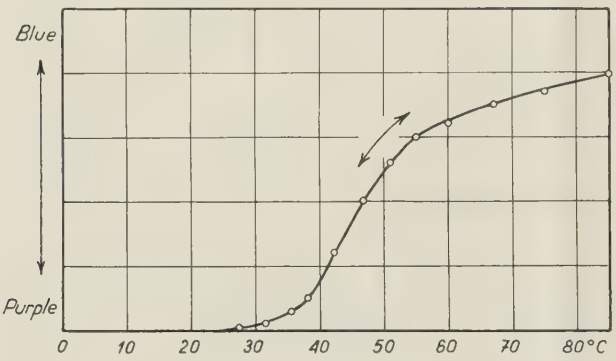
the leukomethylene blue takes place in spite of the presence of ascorbic acid. This fact is proved as follows:

(1) If we make the above-mentioned system containing heparin airtight by a layer of paraffin oil, the effect of heparin on the leukomethylene blue is inhibited completely.

(2) The quantity of leukomethylene blue oxidized by the same amount of heparin depends on the size of surfaces touching the air and the thickness of fluid layers. Mathematically the ratio of the sizes of surfaces referred to the unit of thickness of the layers is equivalent to the ratio of the quantities of oxidized leukomethylene blue. For example: 200 γ heparin oxidized 44 γ leukomethylene blue when the size of surface was 5·5 cm² and the thickness of layer 1·5 cm. The same amount of heparin oxidized 7·45 γ leukomethylene blue when the surface was 1·6 cm² and the thickness of layer 3·2 cm. The ratio of the quantities of oxidized leukomethylene blue is 5·91. The value calculated theoretically is:

$$\frac{5{\cdot}5/1{\cdot}5}{1{\cdot}6/3{\cdot}2} = 7{\cdot}3.$$

In our experiments the theoretically calculated and experimentally found values agreed as far as 80% (for example: 5·91 and 7·3).



(3) If we added to our system Fe^{+++} ions or H_2O_2 the oxidation of leukomethylene blue was much quicker in the tubes containing γ quantities of heparin than in the control tubes containing no heparin.

The effect of heparin in our system could be inhibited by adding to it small quantities of serum (0·1 ml/5 ml). It has not yet been decided whether this phenomenon is to be explained by the modifying effect of the plasma factor of heparin or by the serum protein causing inactivation of heparin.

We could show the same effect when using toluidine blue instead of methylene blue. This system however, does not yield a pure colour, bluish purple, and was not suitable for colorometric estimation.

The above-mentioned effect of heparin depends much on the p_H. We made our experiments at p_H's between 5–6. The spontaneous oxidation of the leukomethylene blue increases at p_H 7 in control tubes considerably and that of the heparin falls below half. At p_H 7·5, practically no heparin effect can be demonstrated. At higher p_H's there is again a heparin effect, but it could not be measured by colorometric methods, as the colour became greenish blue. In strong basic solutions no spontaneous oxidation could be observed.

As to the mechanism of the heparin effect, it seems probable that heparin with a high molecular weight and high negative charge adsorbes on its surface the basic molecule of leukomethylene blue so that the latter becomes very sensitive for oxidative influences. This supposition is supported by further experiments.

The colour-reaction of heparin-toluidine blue that Lison considered as a specific reaction of sulphuric esters of high molecular weight[1] disappears at higher temperatures and reappears at lower temperatures. As the figure shows, the decomposition begins already at 30° C, and the original purple colour takes a bluish shade. The change of colour between 38–40° C becomes very definite, but complete only at 85° C when the solution is entirely blue. While cooling, the blue turns through transitory colours purple again. Different alcohols (methyl-, æthyl-, propyl-, and butylalcohol, glycerol) and the watery solution of sodium choleinicum also brake the toluidine blue-heparin attachment. If we add propyl alcohol to the system the decomposition begins already at 5% concentration and becomes complete in the presence of 30% of propyl alcohol.

As adsorptive forces decrease and even cease on higher temperatures, and as the desorptive property of alcohols and sodium choleinicum solutions are generally known, our supposition that the heparin toluidine blue attachment is an adsorption seems to be proved.

L. A. Pálos and Ch. Kocsán

IInd Medical Clinic of the Péter Pázmány University of Budapest, Hungary, May 25, 1950.

Zusammenfassung

Wir untersuchten die Heparinwirkung auf Redoxsysteme und stellten dabei fest, daß selbst sehr kleine Mengen Heparin die Oxydation des Leukomethylenblaues fördern. Das Heparin als ein großes, negativ geladenes Molekül gibt diese Wirkung durch die Adsorption und die dadurch hervorgerufene Aktivierung des Leukomethylenblau-Moleküls. Für den Ablauf der Oxydation ist eine Sauerstoffquelle notwendig. Außerdem wurde bewiesen, daß die Heparin-Toluidinblau-Bindung eine adsorptive Bindung ist.

[1] L. Lison, C. r. Soc. Biol. *118*, 821 (1935); Arch. Biol. *46*, 599 (1935); Bull. Soc. Chem. Biol. *18*, 225 (1936).

Lyophilization and Mutation in Yeast

Four years back, chromosomal and genic changes were observed in yeast cultured in a cold room[1]. This was to be expected since temperature shocks have been known to have different effects on animals and plants[2]. Gene mutations in animals are accelerated by temperature shocks while the same agency induces a doubling of the chromosome complement in plants[3]. In yeasts, gene mutations[4], chromosal translocations[5], and tetraploidy[6] have been observed as a result of thermal shocks. The question arose whether lyophilization may not produce similar changes[7]. The most important step during the process of lyophilization is to cool the culture suddenly[8]

[1] M. K. Subramaniam and B. Ranganathan, Sci. and Cult. *13*, 102 (1947); Proc. Nat. Inst. Sci. India *14*, 279 (1948). – M. K. Subramaniam, B. Ranganathan, and S. N. Krishna Murthy, Cellule *52*, 39 (1948).

[2] H. J. Muller, Gen. *13*, 279 (1928). – H. H. Plough, Biol. Symp. *6*, 9 (1942). – Th. Dobzhansky, *Genetics and the Origin of Species* (Columbia Univ. Press, 1941).

[3] H. Dermen, Bot. Rev. *6*, 599 (1940).

[4] M. K. Subramaniam, B. Ranganathan, and S. N. Krishna Murthy, Cellule *52*, 39 (1948).

[5] M. Prema Bai, Curr. Sci. *16*, 316 (1947).

[6] M. K. Subramaniam and B. Ranganathan, Proc. Nat. Inst. Sci. India *14*, 279 (1948).

[7] B. Ranganathan, J. Ind. Inst. Sci. (in the press).

[8] L. J. Wickerham and A. A. Andreasen, Wallerstein Lab. Commun. *5*, 165 (1942).

to a very low temperature. The dehydration after this step may not inhibit the mutational step in those cells which are viable[1].

To elucidate this possibility a few cultures of our two chromosome brewery yeast[2] at different physiological states were lyophilized at the Haffkine Institute, Bombay, in the second week of January, 1950. The giant colonies of the control grown at Bangalore at the time these experiments were carried out are illustrated in figures 1 and 2. The colonies are mixtures of mutants[3].

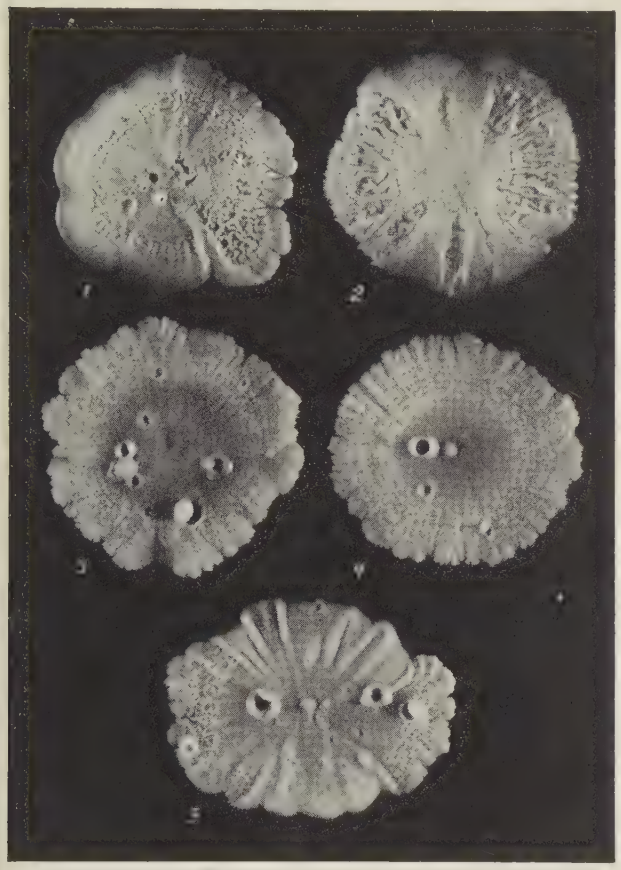


Fig. 1. – By 1 control (12. 10. 45) grown on barley malt agar. 2·9 cm*, 23-day growth, 30. 1. 50.
Fig. 2. – By 1 control (12. 10. 45). 2·1 cm, 16-day growth, 30. 1. 50.
Fig. 3. – By 1 96-hour old culture. Lyophilized on 13. 1. 50. Rejuvenated on 8. 3. 50. 2·8 cm, 11-day growth, 22. 3. 50.
Fig. 4. – By 1 96-hour old culture. Lyophilized on 13. 1. 50. Duplicate ampoule rejuvenated on 8. 3. 50. 2·7 cm, 9-day growth, 22. 3. 50.
Fig. 5. – By 1 control (12. 10. 45). 3·2 cm, 9-day growth, 22. 3. 50.
* Longest Diameter.

A 96-hour old fermenting culture lyophilized and stored in two ampoules was rejuvenated in the first week of March, 1950. The colonies grown from the above are presented as figures 3 and 4. According to the classification given elsewhere[4] the colony in figure 3 belongs to the *Smooth III* while that in fig. 4 is of the *Rough I* category. The resemblance of figures 3 and 4 to figures 14 and 3 respectively presented by SUBRAMANIAM *et al.*[1] is rather striking. These types have already been shown to occur spontaneously as a result of gene mutations[1]. The control from a stock agar slant culture run simultaneously with the colonies of the rejuvenated cultures is illustrated in fig. 5. It is a mixture of *Smooth I*, *Smooth II*, *Smooth III*, and *Rough I* types. *The lyophilized cultures show therefore no similarity to the control at the time of lyophilization or rejuvenation.*

If preservation by freeze-drying produces no genetic changes[2], the rejuvenated cultures should be indistinguishable in their giant colony characteristics from those of the control strain at the commencement of the investigation. Because it is not so, we have to surmise that this method of preservation does produce genetic changes. This is nothing surprising, since it is well known that thermal shocks like an increase in temperature do accelerate the frequency of gene mutations.

M. K. SUBRAMANIAM and L. S. PRAHLADA RAO

Cytogenetics Laboratory, Indian Institute of Science, Bangalore-3, S. India, November 15, 1950.

Zusammenfassung

Eine aus einer Mischung von Mutanten bestehende Hefekultur wurde lyophilisiert. Nach Verjüngung hatte diese Kultur keine Ähnlichkeit mehr mit der Kontrollkultur im Zeitpunkt der Lyophilisierung bzw. der Verjüngung. Die genetischen Veränderungen nach Lyophilisierung können auf Genmutationen zurückgeführt werden.

[1] L. ATKINS, W. MOSES, and P. P. GRAY, Wallerstein Lab. Commun. *12*, 365 (1949).
[2] M. K. SUBRAMANIAM, Proc. Nat. Inst. Sci. India *12*, 143 (1946).
[3] M. K. SUBRAMANIAM, B. RANGANATHAN, and S. N. KRISHNA MURTHY, Cellule *52*, 39 (1948). – S. DURAISWAMI and M. K. SUBRAMANIAM, Cellule *53*, 215 (1950).
[4] M. K. SUBRAMANIAM, B. RANGANATHAN, and S. N. KRISHNA MURTHY, Cellule *52*, 39 (1948).

[1] See Note 4, left column.
[2] L. J. WICKERHAM and A. A. ANDREASEN, Wallerstein Lab. Commun. *5*, 165 (1942).

Über den Einfluß antibiotischer Stoffe auf das Wachstum von Grünalgen

Im Rahmen einer größeren Arbeit wurden Versuche über den Einfluß zweier Antibiotika und eines Antiseptikums auf drei Algenklone gemacht. Solche Untersuchungen wurden anscheinend bisher nicht publiziert. Unsere Ergebnisse seien daher hier mitgeteilt.

Wir stellten uns folgende Versuchsfrage: Wie verhalten sich Grünalgen in ihrer Entwicklung auf Agar-Agar-Nährböden gegenüber Streptomycin, Penicillin und Trypaflavin?

Als Versuchsmaterial dienten drei Grünalgenklone: 1. *Cystococcus Placodii saxicolae Nr. 1400* (vorläufige Bezeichnung[1]); 2. *Coccomyxa ellipsoidea* (*Solorinae saccatae*) Zehnder; 3. *Trentepohlia spec.*

Die Klone 1 und 2 sind Gonidien, die aus den Flechten *Placodium saxicola* bzw. *Solorina saccata* isoliert wurden[1]. Der *Trentepohlia*-Klon wurde von Herrn Prof. Dr. OTTO JAAG während seines Aufenthaltes in Buitenzorg in Reinkultur genommen und für meine Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Algen wurden in Erlenmeyer-Kolben auf Malzagarböden (2% Malzextrakt, 1,7% Agar-Agar) geimpft, die nach der Autoklavierung kurz vor dem Erstarren folgende Zusätze erhalten hatten:

a) Kontrollkolben: Kein Zusatz.
b) Streptomycin (Dihydro-Streptomycin Merck, als Sulfat): Je 1 γ, 10 γ, 25 γ pro Kubikzentimeter Substrat.
c) Penicillin (kristallisiertes Kaliumsalz Penicillin G der Firma «Bristol», Syracus, N. Y.): Je 0,2 γ, 1 γ, 5 γ pro Kubikzentimeter Substrat.

[1] A. ZEHNDER, Ber. Schweiz. Bot. Ges. *59*, 202 (1949).

d) Trypaflavin: Je 6 γ, 30 γ, 150 γ pro Kubikzentimeter Substrat.

Jeder Versuch wurde in 5 oder 10 parallel laufenden Wiederholungen durchgeführt. Nach 8 Wochen wurden die mittleren Durchmesser der Algenkulturen bestimmt und die Messungen statistisch bearbeitet. Die Resultate aus den Klonen 1 und 2 sind in der Tabelle dargestellt. Die Zahlen bedeuten den durchschnittlichen Koloniedurchmesser in Millimeter.

Zusatz zum Substrat	*Cystococcus*	*Coccomyxa*
Kontrolle	10,7 ± 0,64	4,9 ± 0,10
Streptomycin 1 γ pro cm³ .	5,0 ± 0,42	4,1 ± 0,28
10 γ pro cm³ .	0	2,6 ± 0,18
25 γ pro cm³ .	0	0
Penicillin 0,2γ pro cm³ .	14,0 ± 0,57	5,0 ± 0,15
1 γ pro cm³ .	13,4 ± 0,50	5,3 ± 0,33
5 γ pro cm³ .	12,8 ± 0,66	6,0 ± 0,57
Trypaflavin 6 γ pro cm³ .	10,5 ± 0,63	5,1 ± 0,28
30 γ pro cm³ .	10,0 ± 0,77	4,9 ± 0,10
150 γ pro cm³ .	0	4,9 ± 0,29

Cystococcus ist die empfindlichste Alge. 1 γ Streptomycin pro Kubikzentimeter Substrat hemmte das Wachstum eindeutig, ohne aber die Kolonien zum Absterben zu bringen. Mikroskopisch zeigten die Zellen keine Unterschiede gegenüber solchen aus den Kontrollkolben. Auch Zoosporen bildeten sich in unverminderter Zahl. Wurden Algen von diesem Substrat nach 8 Wochen auf Kontrollböden geimpft, so wuchsen sie normal weiter. Die höheren Streptomycindosen töteten die Alge ab: In keinem Fall waren Zellen, nach 8 Wochen aus diesen Kolben auf Kontrollböden geimpft, zum Wachstum zu bringen. Die größere Flächenentwicklung der Alge in den Penicillinkolben ist auf eine flachere Wachstumsform der Kolonien zurückzuführen, die durch eine geringere Festigkeit des Substrates verursacht wurde.

Coccomyxa wurde erst durch eine Dosis von 25 γ Streptomycin pro Kubikzentimeter Nährboden abgetötet. Auch gegenüber Trypaflavin ist der Klon widerstandsfähiger als *Cystococcus*.

Trentepohlia wächst bedeutend langsamer als die beiden anderen Stämme. Die Wuchsform der Kolonien ist halbkugelig oder noch mehr überhöht, so daß der Durchmesser der Kolonien kein zuverlässiges Maß für das Wachstum der Alge darstellt. Eindeutig ergab der Versuch eine Wachstumshemmung der Alge auf dem Substrat mit der höchsten Streptomycindosis. Penicillin und Trypaflavin beeinflußten die Entwicklung nicht.

Den Herren Prof. Dr. E. Gäumann und Prof. Dr. O. Jaag danke ich sehr für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit und das ihr entgegengebrachte Interesse.

Alfons Zehnder

Institut für spezielle Botanik der ETH. Zürich, den 1. Mai 1950.

Résumé

On a étudié l'influence de la streptomycine, de la pénicilline et de la trypaflavine sur le développement de trois chlorophycées appartenant aux genres *Cystococcus*, *Coccomyxa* et *Trentepohlia*. La streptomycine ralentit ou supprime – selon sa concentration – le développement des algues, tandis que la pénicilline n'a aucune influence. La trypaflavine supprime, en concentration élevée, la croissance du *Cystococcus*, mais n'influence pas le développement des deux autres espèces.

Evolution des granules cytoplasmiques et conditions de synthèse des ribonucléoprotéines

Depuis les travaux de Caspersson[1], Brachet[2], etc., la relation entre acide ribonucléique et synthèse de protéines a été maintes fois proposée; avec la découverte des «granules cytoplasmiques», isolables par centrifugation différentielle (Claude[3], Brachet[4], Chantrenne[5], etc.), cette relation s'est sensiblement précisée et récemment Jeener[6], utilisant des solutions salines concentrées, mettait en évidence des procès de dissociation des granules qui semblent confirmer que la synthèse des protéines cellulaires s'effectuerait au niveau des organites les plus lourds et les plus riches en équipements enzymatiques divers.

Il est cependant un autre aspect du problème de l'organisation cellulaire qui, jusqu'à présent, semble n'avoir suscité que peu de travaux: il s'agit des conditions de synthèse des nucléoprotéines elles-mêmes. Or, dans une série de recherches consacrées aux mécanismes de la fécondation chez *Ascaris megalocephala* (Panijel[7]), nous avons montré que l'apport d'une protéine spécifique par le spermatozoïde permettait une synthèse spectaculaire de granules ribonucléoprotéiques dans le cytoplasme ovulaire et que cette synthèse s'effectuait au niveau même de la protéine. Ultérieurement, nous avons indiqué (Panijel[8], Panijel et Pasteels[9]) qu'il s'agissait d'une véritable «recharge» en granules organisés et que cette recharge s'effectuait en deux étapes: l'une comportant la synthèse des ribonucléoprotéines à l'échelon moléculaire («le surnageant» des expériences de centrifugation), l'autre l'inclusion de ces ribonucléoprotéines dans les granules qui sont ensuite progressivement redistribués dans le cytoplasme. Nous voudrions apporter ici un nouvel exemple de procès biochimiques du même ordre qu'il nous a été donné d'étudier sur un matériel analogue.

Avant nous, Pasteels[10] (cf. Panijel[11]) a, en effet, précisé que, lors de la spermatogénèse chez l'*Ascaris*, les granules cytoplasmiques étaient éliminés lors des divisions de maturation sous forme d'une hernie violemment basophile (le «cytophore» des auteurs). Nous avons montré (Panijel[11]) que cette élimination était en relation étroite avec les procès de dissociation des petits granules qui accompagnent les synthèses de protéines deutoplasmiques et que, sous une autre forme, de tels procès se retrouvaient également lors des oogénèses lécithiques. – Mais, ici, le fait qui doit retenir notre attention, c'est que si le matériel basophile du «cytophore» (cf. fig. 1–4) résulte bien, en effet, de l'accumulation des granules cytoplasmiques, il présente cependant un aspect et une structure qui le particularisent singulièrement et le différencient nettement des matériels basophiles usuels. En premier lieu, il manifeste une forte métachromasie; en second lieu, il est possible de montrer par l'emploi des

[1] T. Caspersson, Naturwiss. *29*, 33 (1941).
[2] J. Brachet, Enzymologia *10*, 1, 87 (1941).
[3] A. Claude, Cold Spring Harbor *9*, 263 (1941).
[4] J. Brachet, *Embryologie Chimique* (Paris 1947); C. r. Soc. Biol. *142*, 1241 (1948).
[5] H. Chantrenne, Bioch. Biophys. Acta 1, 387 (1947).
[6] R. Jeener, Bioch. Biophys. Acta *2*, 633 (1948).
[7] J. Panijel, Bull. Soc. Chim. Biol. *29*, 1098 (1947); *30*, 116 (1948); *31*, 510 (1949).
[8] J. Panijel, Bull. Soc. Chim. Biol. *31*, 1, 387 (1949).
[9] J. Panijel et J. Pasteels, à paraître Arch. de Biol. 1951.
[10] J. Pasteels, Arch. Biol. *59*, 4, 405 (1948).
[11] J. Panijel, *Thèse principale* (Paris 1950). «Le métabolisme des nucléoprotéines dans la gamétogénèse et la fécondation.» A paraître (Hermann ed., Paris 1951).

solvants neutres (PANIJEL[1]) que les conditions de solubilité de ces ribonucléoprotéines les apparentent à celles du nucléole et non à celles que l'on rencontre généralement dans les cytoplasmes.

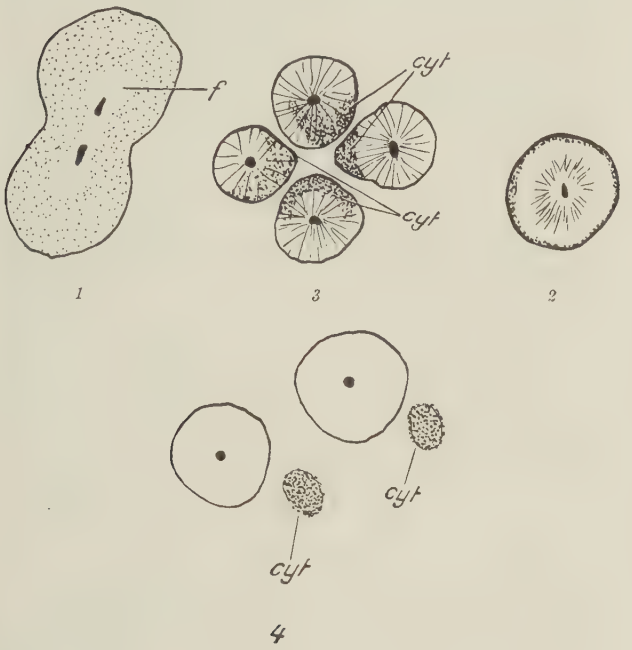


Fig. 1–4. – Etapes progressives lors de la deuxième division de maturation de l'accumulation des granules dans le cytophore et de son élimination.

Ces observations nous conduisaient à considérer que l'élimination de la basophilie cytoplasmique, correspondant, nous l'avons dit, à la dissociation des petits granules, devait se présenter sous forme d'éléments de structure différente de celle des petits granules.

Nous avons pu confirmer cette conception par l'emploi des méthodes de centrifugation différentielle. – Les résultats des analyses sont les suivants:

a) Dosage de l'acide ribonucléique total (méthode de DAVIDSON et WAYMOUTH[2]):

Jeunes spermatocytes: 0,688 mg% (poids sec);
spermatides avec cytophores: 0,085 mg% (poids sec);
spermatides sans cytophores: 0,005 mg% (poids sec).

Le fait est donc hors de doute: comme le prouve l'expérimentation cytochimique, le cytophore contient bien de l'acide ribonucléique.

b) Expériences de centrifugation différentielle (en KCl M); définition des fractions en:

G. G. (gros granules: 20 min. de centrifugation à 6000 g);
M. G. (moyens granules: 10 min. de centrifugation à 100000 g);
P. G. (petits granules: 1 h. 30 min. de centrifugation à 100000 g);
S. (surnageant restant après sédimentation de P.G.).

On voit donc que la séparation du cytophore correspond bien à l'élimination de la quasi-totalité de l'acide ribonucléique résiduel et que celui-ci appartient alors aux éléments les plus légers, comme le prouve le taux élevé en acide ribonucléique du surnageant au seul moment de la séparation du cytophore. Or il y a de

	N[1]	*RNA*[2]	*RNA*/N[3]
Jeunes spermatocytes			
Gros granules	90	49	544
Moyens granules	25	41	1640
Petits granules	130	251	1930
Surnageant	98	43	439
Spermatides et cytophores			
Gros granules	110	62	563
Moyens granules	48	67	1343
Petits granules	94	169	1798
Surnageant	240	260	1083
Spermatides			
Gros granules	33	18	600
Moyens granules	28	36	1295
Petits granules	12	19	1583
Surnageant	18	7	388

[1] γ N par cm^3 de suspension.
[2] γ R. N. A. par cm^3 de suspension.
[3] γ R. N. A. par mg de N.

bonnes raisons de penser que les éléments du dit surnageant sont de dimensions moléculaires: on est donc amené à considérer comme très vraisemblable le fait que, dans le cas de la spermatogénèse d'*Ascaris*, la dissociation des petits et moyens granules (qui accompagne la synthèse d'une protéine caractéristique à valeur de vitellus[1]) aboutit à la formation de ribonucléoprotéines moléculaires. Or, ce procès qui est l'inverse de celui que nous avons mis en évidence dans le cas de la recharge de l'œuf lors de la fécondation (PANIJEL[2]) est lui-même réversible: en effet, les cytophores, après leur séparation des spermatides, sont phagocytés par les cellules pariétales des testicules; on constate alors que les zônes de cytoplasme entourant les vacuoles où sont inclus les cytophores se rechargent progressivement en basophilie cytoplasmique typique, au fur et à mesure que s'effectue la digestion des cytophores (cf. fig. 5).

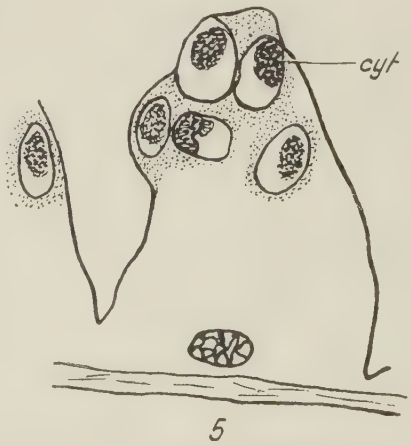


Fig. 5. – Attaque des cytophores dans les cellules pariétales et apparition de la basophilie cytoplasmique.

Les ribonucléoprotéines des cytophores sont donc d'abord synthétisées sous forme moléculaire, puis organisées au sein des granules cytoplasmiques.

[1] J. PANIJEL, *Thèse complémentaire* (Paris 1950). – «Les problèmes de l'histochimie et la biologie cellulaire.» A paraître, Hermann ed. (Paris 1951).
[2] J. DAVIDSON et C. WAYMOUTH, Bioch. J. *38*, 379 (1944).

[1] J. PANIJEL, *Thèse principale* (Paris 1950). – «Le métabolisme des nucléoprotéines dans la gamétogénèse et la fécondation.» A paraître, Hermann ed. (Paris 1951).
[2] J. PANIJEL, Bull. Soc. Chim. Biol. *29*, 1098 (1947); *30*, 116 (1948); *31*, 510 (1949).

On voit donc que ces résultats permettent d'envisager l'organisation des granules comme un procès en deux étapes: la première comportant une synthèse moléculaire de ribonucléoprotéines, la seconde la formation des granules eux-mêmes à partir de ce matériel. On sait combien, par de nombreux aspects, les virus sont proches des granules cytoplasmiques: il serait tentant de supposer que le schéma de synthèse des granules auquel conduisent nos observations s'applique également à la multiplication des virus (et des bactériophages); en effet on sait que le pouvoir infectieux, lors des synthèses de virus, apparaît brusquement et augmente très rapidement après une période de latence où il reste extrêmement faible. Il est possible que cette période de latence corresponde à l'étape de synthèse moléculaire et que le pouvoir infectieux n'apparaisse que lors de la seconde étape: c'est-à-dire après organisation des particules à partir de ce matériel transformable.

Des recherches en cours nous permettront, nous l'espérons, de préciser de tels procès qui nous paraissent directement liés aux conditions d'autocatalyse des systèmes protéiques. Jacques Panijel

Institut de recherches sur le Cancer de l'Université de Paris et du C.N.R.S., Service de Biochimie, Villejuif (Seine), le 15 juin 1950.

Summary

It has been observed that during the spermiogenesis of *Ascaris megalocephale* a rapid and considerable elimination of R.N.A. takes place. This process is due to the dissociation of cytoplasmic granules into molecular elements (supernatant). Reciprocally, during the phagocytosis of R.N.A. eliminated by the parietal cells, formation of granules from the supernatant has been observed. The conditions of synthesis of cytoplasmic granules and the relations with the elements of molecular size (supernatant) are discussed.

—

Preparation of Rabbit Anti-Serum for Rat-Liver Mitochondria. Its Action on Mitochondria Succinoxidase

Many techniques have been described for the isolation in a state of high purity of nuclei, mitochondria, and microsomes from cells[1].

In this paper the preparation of rabbit anti-rat liver mitochondria serum and its action on mitochondria succinoxidase are described.

Mitochondria were isolated from rat liver according to Hogeboom *et al.*[1]. After washing 4–5 times in 0·88 M sucrose solution to remove traces of foreign proteins, they were suspended in 3 ml of 0·15 M NaCl and injected intravenously into a normal rabbit. 8 inoculations were made at 3 day intervals, using Besredka's technique to avoid anaphylactic shock. Antibodies cannot be demonstrated by agglutination, since spontaneous agglutination of mitochondria occurs in the presence of electrolytes. The immune serum produced a rapid heavy agglutination, which is different from the microagglutination produced by salts, but it was found that an entirely similar phenomenon occurs with normal sera of rabbits, rats, and guinea pigs.

Lysis in presence of complement may be employed, but great caution must be used, since after a few hours spontaneous lysis occurs also without immune serum. Lysis is specific only if it occurs within 1–2 hours. Microscopic observation shows a rapid swelling of the mitochondria in presence of immune serum and complement, which is followed by complete destruction. When lysis occurs, a thick protein precipitate can be observed. But the best method for antibody demonstration was complement fixation. The titrations were performed by using serial dilutions of inactivated immune serum (1·0 ml), 0·05 ml of fresh guinea pig complement pooled from the blood of 3 animals, and 0·5 ml of a mitochondrial suspension containing the mitochondria isolated from 1 g of rat liver or kidney in 10 ml of saline. The tubes were incubated at 37·5°C for 1 hour, and sensitized sheep cells were added as usual.

In presence of rat liver mitochondria, the titers were up to 1:1280, in presence of rat kidney mitochondria up to 1:50 in some instances, whereas no fixation was observed when mitochondria from either liver or kidney of mice, guinea pigs or rabbits were used.

The action of anti-mitochondria serum on the succinoxidase system contained in mitochondria from both liver and kidney was tested in the Warburg apparatus, with 0·2 M sodium succinate added (Table I).

Washed mitochondria isolated from 1 g liver or 0·5 g kidney were evenly suspended in 9·5 ml phosphate buffer (p_H 7·4) in Warburg vessels (3·0 ml of mitochondrial suspension + 0·2 ml sodium succinate and 0·2 ml 20% KOH in each vessel). Each determination was made in triplicate. 0·1 ml of inactivated anti-rat

[1] G. Crossmon, Science *85*, 250 (1937). – C. A. Stoneburg, J. Biol. Chem. *129*, 189 (1939). – R. Vendrely et C. Vendrely, Exper. *4*, 434 (1948). – A. L. Dounce, J. Biol. Chem. *147*, 695 (1943). – R. R. Bensley and N. L. Hoerr, Anat. Rec. *60*, 251 (1934). – A. Lazarow, Biol. Symp. Lancaster *10*, 9 (1943). – E. S. G. Barron, Biol. Symp. Lancaster *10*, 27 (1943). – A. Claude, J. Exp. Med. *80*, 19 (1944). – W. C. Schneider, J. Biol. Chem. *165*, 585 (1946). – W. C. Schneider, G. H. Hogeboom, and G. E. Pallade, J. Biol. Chem. *172*, 619 (1948). – G. H. Hogeboom, A. Claude, and R. D. Hotchkiss, J. Biol. Chem. *165*, 615 (1946). – W. C. Schneider, J. Biol. Chem. *176*, 259 (1948). – E. P. Kennedy and A. L. Lehninger, J. Biol. Chem. *172*, 847 (1948). – G. H. Hogeboom, J. Biol. Chem. *177*, 847 (1949).

[1] G. H. Hogeboom, A. Claude, and R. D. Hotchkiss, J. Biol. Chem. *165*, 615 (1946).

Table I

Action of rabbit anti-serum for rat liver mitochondria on succinoxidase activity of purified mitochondria. (Average values of the percentual acceleration of activity.)

No. of exps.	Source of mitochondria	Liver		Kidney	
		serum	serum + complement	serum	serum + complement
7	rat	−10·31 ± 2·35	+20·16 ± 7·09	+17·01 ± 2·31	+30·60 ± 6·48
2	mouse	+20·13 ± 0·34	+30·64 ± 5·48	–	–
1	guinea pig	+16·16	+24·12	+ 7·12	+24·13
1	rabbit	+21·49	+22·79	+18·94	+25·75

liver mitochondria serum or 0·05 ml of fresh guinea pig complement were added respectively. Control values for immune serum plus succinate and for complement plus succinate were subtracted. The O_2-uptake was followed for 40 minutes and the results summarized in Tables I and II.

Table II

Action of normal sera on succinoxidase activity of purified mitochondria (average values of the percentual acceleration of activity)

No. of exps.	Source of serum	Source of mitochondria	Liver	Kidney
5	guinea pig	rat	+16·84 ± 4·03	+24·55 ± 1·63
2	guinea pig	mouse	+13·38 ± 2·14	+14·40 ± 3·0
2	guinea pig*	rat	+26·93 ± 3·98	+15·68 ± 1·89
1	rabbit	rat	+20·40	+12·60
1	rat	rat	+ 7·90	+12·20
1	rat	rabbit	+ 9·34	+10·32
1	rat	guinea pig	+10·05	+12·40
1	horse	rat	+13·31	+12·10
1	man	rat	+25·45	+22·40
1	dog	rat	+15·22	+13·60

* Inactivated serum.

Immune serum had only a weak inhibitory action on succinoxidase activity of rat liver mitochondria: addition of complement accelerated to some extent. The succinoxidase activity of rat kidney mitochondria was always accelerated by immune serum with and without complement. While the inhibiting action of immune serum on rat liver mitochondria is probably due to a reduction of the surface area following agglutination, the acceleration produced by complement can be explained by the fact that lysis releases the enzyme into solution and facilitates the contact with the substrate.

Normal guinea pig serum has an accelerating action on succinoxidase of mitochondria from both liver and kidney of the rat. Thus the acceleration occurring in presence of immune serum and of complement is probably unspecific.

The accelerating effect of normal guinea pig serum persists after heating at 56°C for 30 minutes: sera from rabbit, man, mouse, and dog also accelerate the reaction.

The succinoxidase activity of mitochondria decreases after incubation with normal serum for 1 hour at 37·5°. It was supposed that the accelerating action of normal sera was due to serum lipase which brings the enzyme nearer to the substrate by splitting the peripheral lipid surface of mitochondria. The decrease of activity observed after incubation at 37·5°C for 1 hour, which shows that rapid inactivation of the enzyme occurs in presence of normal serum, is in support of this hypothesis.

Experiments with the following inhibitors of serum lipase were performed: benzaldehyde, o-, m-, and p-tri-cresylphosphate (Hottinger, Bloch[1]) (Tables III, IV).

The inhibiting activity of these compounds on serum lipase was tested in the Warburg apparatus with 0·03 M tributyrin as substrate in the presence of 0·1 ml fresh guinea pig serum. The hydrolysis of tributyrin was inhibited as follows: 50% in the presence of 5 mg benzaldehyde; 96% in the presence of 1 mg o-tri-cresylphosphate; 60 and 30% respectively with 10 mg of m- and p-tri-cresylphosphate. The same inhibitors were added to systems containing mitochondria, sodium succinate and serum. The results are summarized in Tables III and IV. It was found that these inhibitors antagonize almost completely the accelerating effect of normal sera on mitochondrial succinoxidase and can also delay the inactivation of the enzyme incubated with serum at 37·5°C for 1 hour.

The experiments suggest that accelerating effects of normal sera are due to the activity of serum lipase.

I am indebted to Miss G. Mislap, of the Hygiene Institute of the University of Basle, for supplying o-, m-, and p-tri-cresylphosphate.

Mario Umberto Dianzani

Department of General Pathology, University of Siena, Italy, March 25, 1950.

[1] A. Hottinger und H. Bloch, Helv. chim. acta *26*, 142 (1943).

Table III

Inhibition with lipase inhibitors of acceleration of succinoxidase activity of rat mitochondria determined by guinea pig normal serum (average values of the percentual acceleration of activity)

No. of exps.	Lipase inhibitors	Liver		Kidney	
		Serum	serum + lipase inhibitor	serum	serum + lipase inhibitor
4	Benzaldehyde	+23·39 ± 2·67	+4·33 ± 2·25	+29·48 ± 2·92	+ 3·70 ± 3·66
3	O-tri-cresylphosphate	+21·95 ± 1·84	0	+28·54 ± 1·85	+ 0·42 ± 0·39
2	M-tri-cresylphosphate	+23·44 ± 3·95	+5·82 ± 0·29	+27·64 ± 0·7	+ 9·98 ± 0·21
2	P-tri-cresylphosphate	+21·65 ± 0·72	+8·14 ± 1·43	+26·95 ± 2·66	+10·71 ± 0·63

Table IV

Acceleration of succinoxidase activity of rat mitochondria by guinea pig normal serum before and after incubation for 1 hour at 37·5°C. Action of lipase inhibitors added at the beginning of incubation (Average values of the percentual acceleration of activity)

No. of exps.	Inhibitor added	Liver		Kidney	
		before incubation	after incubation	before incubation	after incubation
3	none	+30·08 ± 2·88	−24·98 ± 1·10	+35·53 ± 3·09	− 15·53 ± 1·82
2	O-tri-cresylphosphate	+23·84 ± 1·75	− 0·74 ± 0·05	+30·27 ± 0·29	− 1·46 ± 0·45
1	M-tri-cresylphosphate	+26·40	− 3·12	+22·16	− 3·16
1	P-tri-cresylphosphate	+24·17	− 6·12	+36·18	− 5·16

Résumé

L'auteur a obtenu dans le lapin un sérum antimitochondre du foie de rat. Le sérum antimitochondre a une faible action inhibante sur la succinoxydase des mitochondres du foie du rat, tandis qu'il accélère l'activité des mitochondres du rein. Les sérums normaux de cobayes, de lapins, de rats, de souris, de chiens et d'hommes ont une action accélérante qui est supprimée après incubation à 37,5°C pour 30 minutes.

L'auteur démontre, par les inhibiteurs de la lipase du sérum, que l'action des sérums normaux doit être rapportée à cet enzyme.

Enzymatic Activity and Protein Amounts in the Liver

Virtanen and coll.[1] relate interesting observations on the behaviour of certain enzymatic activities of *Escherichia Coli, Torulopsis utilis, Pseudomonas fluorescens,* when the protein amount of the cell of the microorganisms is reduced by the development of such microorganisms on satisfactory culture media.

When their nitrogen content diminishes, the activity of certain enzymes [enzymatic systems of respiration (*Escherichia coli, Torulopsis utilis*), catalase (*E. coli, Torulopsis utilis*), proteolytic enzymes (*E. coli, Torulopsis utilis, Pseudomonas fluorescens*), saccharase (*Torulopsis utilis*)], remains almost the same as in that of the normal cell; other enzymes, on the contrary [saccharase (*E. coli*), lactase (*E. coli*), formic dehydrogenase (*E. coli*), enzymatic system of the anaerobe glycolysis (*E. coli*)], show a remarkable decrease in their activity. Therefore in the cells of microorganisms and perhaps of animal organisms, certain enzymes must be present (Virtanen and Winkler[2]) which are indispensable for life and which maintain their activity even when the nitrogen content is reduced, and other enzymes, not indispensable for life, which lose most or all their activity when the nitrogen content of the cell is reduced. Yet, Miller[3] observed in the liver of fasting rats after 7 days a decrease in the activity of some enzymes (catalase, alkaline phosphatase, xanthine dehydrogenase, cathepsin) of the same degree or higher than the protein loss of the tissue. Harkness, Seifter, Novic, and Muntwyler[4] also in the liver of rats receiving a protein-deficient diet, found a decrease in the concentration of A co-enzyme, which is essential for the sulfamide acetylation, proportional to the reduction of the protein concentration in the liver. Therefore the behaviour of the enzymes in the tissues of animals deficient in nitrogen analogous to that observed in micro-organisms is not yet ascertained.

To examine the question, I compared the activity of some enzymes (esterase, phosphomonoesterase, pyrophosphatase, adenosintriphosphatase, dipeptidase, arginase, catalase, succinic dehydrogenase, choline dehydrogenase) of the liver of rats receiving a qualitatively and quantitatively suitable diet, with that of rats receiving a protein deficient diet, followed by a remarkable decrease of the nitrogen content of the tissue.

Therefore 10–12 weeks old rats (♂) were fed during 25 days on a diet composed of saccharose (87%), olive oil (8%), a salt mixture (4%), dry yeast (1%), with the addition of a suitable amount of thiamine, riboflavin, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, inositol, choline, axerophthol, calciferol, tocoferol, 2-methyl-1,4-naphtoquinone. Ten rats fed with the same diet, but with casein substituted for part of the saccharose (24%), were used as animals of control. After 25 days, the rats were killed by decapitation, after fasting 18 hours. Immediately their liver was removed and used to test the enzymatic activity as a homogenate, prepared in Potter and Elvehjem's apparatus.

The esterase was determined according to Lenti[1]. Phosphomonoesterase and adenosintriphosphatase were measured in accordance with methods suggested by Cafiero[2]. The determination of dipeptidase was obtained by measuring the carboxyl groups liberated in the glycil-glycine hydrolysis after formaldehyde blocking of the aminic groups. The arginase was determined according to Lenti[3]. For the catalase we used the method suggested by von Euler and Josephson[4] Succinic dehydrogenase and choline dehydrogenase were tested, measuring the O_2 loss in Warburg's apparatus.

The quantity of water, lipids and nitrogen was ascertained in parts of the liver. Water was calculated from the difference of weight after drying to 103°, lipids after ether extraction of the dry material. Nitrogen was determined on dried and lipide-free material using Kjeldahl micromethod.

Under the above mentioned conditions, the liver of the rats receiving a protein-deficient diet shows, as has been long known, a decrease of nitrogen content and an increase of lipide content in relation to the liver of animals receiving a quantitatively and qualitatively normal diet, while the water content is not appreciably modified (Table I).

Table I

Water, lipid and nitrogen content of the liver of rats receiving a normal and a protein-deficient diet

Diet	Water g/kg	Lipide g/kg	Nitrogen g/kg
Of control	677 (643–699)	54 (31–79)	30 (20–35)
Protein-deficient . . .	685 (639–717)	96 (62–130)	19 (13–23)
Difference in %	−1·2	+77·8	−36·7

The behaviour of the examined enzymatic activities differs highly. Phosphomonoesterase shows a very remarkable increase. Esterase, catalase, choline dehydrogenase show a remarkable decrease, a less remarkable decrease is to be observed for pyrophosphatase, adenosintriphosphatase, arginase, and succinic dehydrogenase. Dipeptidase remains unchanged (Table II).

From such various changes of the activity of the examined enzymes it is impossible to assume, at least under the adopted experimental conditions, a definite relation between the concentration of the above-mentioned enzymes and the protein concentration of the liver. Even a division of the liver enzymes into indispensable and

[1] A. I. Virtanen, Ann. Acad. Sci. Fennicae [A. II], No. 36 (1949).

[2] A. I. Virtanen and V. Winkler, Acta chem. Scand. *3*, 272 (1949).

[3] L. Miller, J. Biol. Chem. *172*, 113 (1948).

[4] D. M. Harkness, S. Seifter, B. Novič, and E. Muntwyler, Arch. Biochem. *22*, 204 (1949).

[1] C. Lenti, Arch. Sci. Biol. *25*, 254 (1939).

[2] M. Cafiero, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *24*, 1322 (1948); *26*, 159 (1950).

[3] C. Lenti, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *20*, 636 (1945).

[4] H. von Euler and K. Josephson, Liebigs Ann. *452*, 158 (1927).

Table II

Enzymatic activities of the liver of rats receiving a normal and a protein-wanting diet enzymes

Diet	Esterase ml. 0·01 *n* NaOH	Phosphomonoesterase inorganic P split off γ	Pyrophosphatase inorganic P split off γ
Of control . . .	3·19 (2·30–3·96)	13·7 (9·5–20·9)	54·6 (45·6–74·1)
Protein-deficient	0·76 (0·33–1·12)	49·8 (28·5–64·7)	39·8 (31·3–49·4)
Difference in % .	− 76·2	+ 263·5	− 27·1
	Adenosintriphosphatase inorganic P split off (γ)	Dipeptidase % of hydrolised glycil-gycline	Arginase % of arginine split off
Of control . . .	109·1 (93·1–125·4)	88·3 (79·6–97·3)	93·3 (80·1–99·0)
Protein-deficient	84·4 (76·0–93·0)	81·3 (69·9–90·0)	70·7 (52·5–85·0)
Difference in % .	− 22·6	− 7·9	− 24·2
	Catalase $K_{10^{-2}}$	Succinic-dehydrogenase QO_2	Choline-dehydrogenase QO_2
Of control . . .	2·2 (1·5–3·4)	70·9 (52·6–88·9)	69·6 (55·0–85·4)
Protein-deficient	0·70 (0.43–0·93)	55·9 (42·1–76·6)	14·1 (2·3–26·3)
Difference in % .	− 68·2	− 21·1	− 79·7

not indispensable according to VIRTANEN and WINKLER[1] for the microorganisms does not seem to be feasible at present.

NORA BARGONI

Department of Biological Chemistry, University of Torino, August 17, 1950.

Zusammenfassung

Die Verfasserin hat die Wirkung einer eiweißarmen, im übrigen aber quantitativ und qualitativ ausreichenden Diät auf den Gehalt verschiedener Enzyme der Rattenleber untersucht. Geprüft wurden Esterase, Phosphomonoesterase, Adenosintriphosphatase, Pyrophosphatase, Dipeptidase, Arginase, Katalase, Succinodehydrogenase und Cholindehydrogenase. Unter den erwähnten Versuchsbedingungen wurde folgendes gefunden: Vermehrte Aktivität der Phosphomonoesterase; verringerte Aktivität der Esterase, Katalase, Cholindehydrogenase, Pyrophosphatase, Adenosintriphosphatase, Arginase, Succinodehydrogenase und eine unveränderte Aktivität der Dipeptidase. Diese Effekte sind mit einer Stickstoffabnahme und einer Zunahme in der Lipoide der Leber verbunden, während der Wassergehalt ungefähr der gleiche bleibt.

[1] A. I. VIRTANEN and V. WINKLER, Acta chem. Scand. *3*, 272 (1949).

Cloroamine e anergia mesenchimale

La reazione delle cellule del sistema istiocitario del polmone, come noi l'abbiamo osservata a seguito della iniezione intraparenchimale di una piccola dose di istamina, in vari animali da esperimento, presenta, come caratteristica essenziale, la iperplasia intensa di tutti gli elementi istiocitari locali[1]. Il polmone si presta bene per lo studio di questa reazione perchè è un organo prevalentemente vascolo-connettivale. Per i suoi attributi anatomici (formazione di barriere cellulari) e funzionali (formazione di globuline anticorpo, di principi protettivi-opsonine, proteasi, alessina, ecc.)[2] questa reazione mesenchimale iperplastica ha significato altamente difensivo.

Si deve ritenere che la moltiplicazione delle cellule mesenchimali sia regolata, come avviene per le cellule di altri tessuti, dalle modificazioni del rapporto glicolisi-respirazione[3] nel senso che ogni influenza che può dare la spinta alla moltiplicazione cellulare mette in funzione sempre lo stesso meccanismo di emergenza, la glicolisi, quello stesso che ha luogo ogni qualvolta non vi sia O_2 sufficiente per adeguare le esigenze della respirazione alla richiesta energetica di un tessuto[4]: in funzione della nota regola di Pasteur, un parziale deficit di O_2 deve agire come stimolo della moltiplicazione delle cellule. In questo senso l'istamina, riducendo gli scambi respiratori delle cellule[5], ne attiverebbe i processi glicolitici e quindi la capacità moltiplicativa.

Poichè questa reazione connettivale iperplastica risulterebbe così in funzione di un elevato rapporto glicosio glicolizzato: glicosio ossidato, apparirà interessante che a noi sia riuscito di dimostrare, in conigli gravemente diabetizzati con allossana, la quasi completa anergia del connettivo polmonare, dopo stimolo istaminico, pneumotoracico e papainico[6]. In base a questi risultati possiamo ritenere probabile che anche altre condizioni sperimentali che compromettano il metabolismo glicidico, siano in grado di inibire la reazione connettivale iperplastica: modernamente infatti si accetta come dimostrato[7], che molte sostanze che impediscono la moltiplicazione cellulare hanno in comune la capacità di ledere i meccanismi enzimatici del metabolismo carboidrato.

Così come in animali gravemente diabetizzati con allossana[6], anche con dosi tossiche di azoipriti abbiamo potuto dimostrare la inibizione della reazione istiocitaria iperplastica da istamina, nel polmone.

Sono evidenti i punti di contatto fra le due condizioni, diabetica e tossica da cloroamine: l'ostacolo frapposto dalle azoipriti (corpi tioloprivi[8]) ad una rapida utilizzazione glicidica sarebbe da riferire in particolare, all'inibizione di una serie di enzimi —SH, vettori di fosfati,

[1] M. ZACCO, Fisiol. e Med. *2*, 307, 315 (1948). – C. PANÀ e M. ZACCO, Ann. Ist. C. Forlanini *4*, 453 (1949).

[2] Rif. in: P. GRABAR, *Les globulines du sérum sanguin* (Masson, Paris 1947).

[3] E. BUMM, Dtsch. med. Wschr. *31*, 1173 (1934). – F. P. MAZZA, Atti R. Acc. Sci. Torino *75* (1939/40). – P. RONDONI, Biochimica, U.T.E.T., Torino (1942).

[4] C. H. BEST e N. B. TAYLOR, *The physiological basis of medical practice* (Williams-Wilkins Co., Baltimore, 1945), p. 592.

[5] A. RÜHL, Arch. exp. Path. u. Pharm. *158*, 282 (1930). – M. ZACCO e G. CIASCA, Fol. Endocrinol. *3*, 149 (1950). – M. ZACCO, Rec. Progr. Med. *9*, 186 (1950).

[6] M. ZACCO e G. CIASCA, Fol. Endocrinol. *3*, 149 (1950).

[7] P. DUSTIN jr. e J. LECOMTE, First Internat. Congr. of Biochem. Cambridge, August (1949), Abstract No. 89/7, p. 256.

[8] Z. M. BACQ, Exper. *5*, 207 (1949); *2*, 354 (1946); *Les corps thioloprives*, in: *Aspects actuels de l'Enzymologie* (Masson, Paris 1947), p. 126.

detti fosfochinasi[1] indispensabili al normale metabolismo degli idrati di carbonio. (L'inibizione dell'esochinasi del lievito sembra verificarsi par azione del mustard gas[2,3] indipendentemente dall'ossidazione del gruppo sulfidrile.)

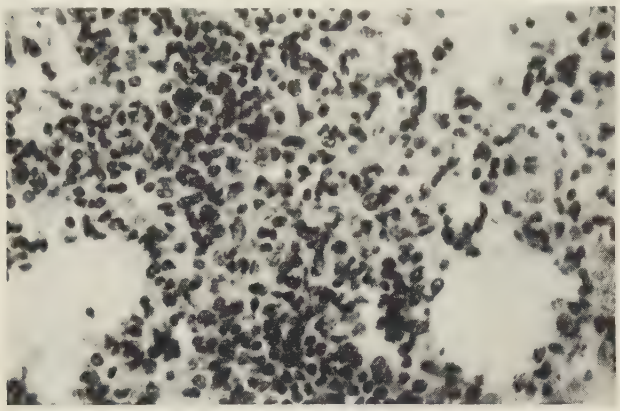


Fig. 1. – Aspetto caratteristico in un polmone di cavia dopo 11 giorni dalla prima iniezione intraparenchimale di istamina.

Le cloroamine, inoltre, attivano certi processi ossidoriduttivi (lattico e succino deidrasi[4]) per cui la glicolisi verrebbe anche ridotta, secondo quanto si è detto, dall'aumento dell'ossidazione del glicosio.

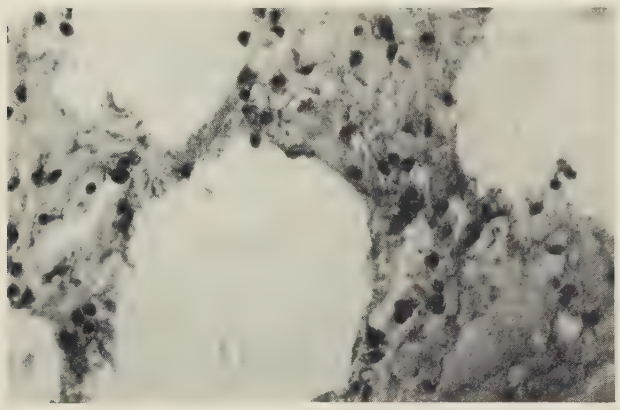


Fig. 2. – Aspetto caratteristico in un polmone di cavia trattata con cloroamine (1,0 mg/kg pro die), dopo 11 giorni dalla prima iniezione intraparenchimale di istamina.

24 cavie del peso di 500–650 g, maschi e femmine, sono state impiegate: 12 subirono un trattamento quotidiano con 0,5–1,0 mg/kg p.c., di bis-beta-cloroetilamina per via sottocutanea: a partire dal secondo giorno di trattamento si iniettò, per 3 volte a giorni alterni, nel polmone destro di ogni animale, una dose di 0,05–0,07 mg di istamina bicloridrato in 0,10 cm^3 di soluzione fisiologica.

Altrettanti animali di controllo subirono il solo trattamento istaminico, e furono sacrificati man mano, in coppia con ogni animale trattato. La resistenza a dosi tossiche di cloroamine è piuttosto limitata; alcuni animali han potuto sopravvivere fino al 9°–10°–11° giorno essendo stato il trattamento sospeso al 7°.

Lo studio istologico della reazione connettivale del parenchima polmonare negli animali trattati con cloroamina e nei controlli, ha dato i risultati seguenti (vedi fig. 1 e 2):

a) La reazione connettivale produttiva del polmone, evidentissima negli animali controllo, è molto scarsa negli animali trattati con cloroamine; cio è più particolarmente evidente nei casi degli animali più a lungo sopravvissuti (8–11 giorni);

b) I setti interalveolari, nei polmoni degli animali trattati con cloroamine, si presentano quasi ovunque imbibiti da una considerevole quantità di liquido essudato, in cui si notano rari elementi di tipo istiocitario.

Risulta che[1], mediante l'uso di cloroamine, era già stata osservata inibizione della reazione iperplastica istiocitaria periarteritica da ipersensibilità a siero eterologo nel coniglio; parallelamente risultò inibita anche la formazione di anticorpi e la ipersensibilità cutanea: ciò interessa i rapporti della reazione anticorpale con quella reticolo istiocitaria e pone in evidenza il significato difensivo, anatomico e umorale, di quest'ultima; anche gli effetti capillarotossici ed exemizzanti delle azoipriti sono stati osservati e studiati[2].

Molte modalità di azione citostatica e citoinvolutiva sono state attribuite alle cloroamine, tuttavia, in base alle recenti acquisizioni sull'attività antimitotica delle sostanze che inibiscono la utilizzazione dei glicidi, ci sembra avvalorata la tesi[3] secondo cui l'azione antimitotica delle cloroamine sarebbe da riferire allo spostamento del rapporto glicosio glicolizzato/glicosio ossidato verso valori sufficientemente bassi da rendere termodinamicamente impossibili[4] i processi della moltiplicazione cellulare.

Michele Zacco e Giuseppe Ciasca

Istituto di Clinica Medica dell'Università di Bari, luglio 30, 1950.

Zusammenfassung

Die Autoren zeigen, daß die hyperplastische Reaktion des Lungenbindegewebes, welche beim Meerschweinchen regelmäßig durch lokale Reizung mit Histamin hervorgerufen werden kann, durch Chloramin vollständig verhindert wird.

Gestützt auf histologische Studien wird zur Deutung auf die antimitotische Wirkung der Stickstoff-Senfgas-Verbindungen verwiesen.

[1] D. M. Needham e M. Dixon, rif. in: Malaguzzi Valeri e collab.[4]

[2] Rif. in: C. Auerbach, Exper. *1*, 17 (1950).

[3] R. Heyningen, Report No. 10, Cambridge Biochemical Lab. (1950).

[4] C. Malaguzzi Valeri, F. di Raimondo e N. Vicino, Progr. Med. *13*, 407 (1949).

[1] S. C. Bukantz e Collab., J. Lab. and Clin. Med. *33*, 1463 (1948); Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *72*, 21 (1949).

[2] L. Kreyberg e O. E. Hanssen, Acta Path. et Microbiol. Scand. *6*, 809 (1949).

[3] C. Malaguzzi Valeri, F. di Raimondo e N. Vicino, Progr. Med. *13*, 407 (1949).

[4] R. Rashewsky, rif. in: Mazza[2].

Endocrine Activity of the Spermatogenic Tissue demonstrated in the Rat by Means of the Administration of Large Quantities of Gonadotrophins

The existence has long been discussed of an endocrine activity of the testis in connection with the germinal epithelium cells or at least of the seminiferous tubules, apart therefore from the endocrine function exerted by

the interstitial tissue. According to the majority of authors this secretive activity should be brought particularly in connection with the gonadotrophic function of the hypophysis.

As far back as 1923, MOTTRAM and CRAMER[1] observed that by irradiating the rats' testes with small doses of X-rays, so as not to injure the interstitial tissue, the pituitary of the animals treated presented a castration picture; since also according to WITSCHI et al.[2], as well as to JOHNSTON[3], such a type of irradiation has no influence upon either the interstitial tissue or the accessories, it is evident that the castration picture thus obtained is not due to a deficiency in androgens. This is confirmed by the fact that the amount of androgen necessary to prevent the onset of the histological picture of the castration pituitary (or to bring it back to normal), is much higher than that which can be assumed to be normally secreted by the testis, and that is true both in the rat (SCHOELLER *et al.*[4]), and in man (FRANK and SALMON[5]). There are finally many clinical data which lead us to believe that also in man the regulation of the gonadotrophic activity of the anterior pituitary depends upon the tissue of the seminiferoustu bules: in oligospermia and in degenerative tubular lesions the urine content of gonadotrophins is increased even if the elimination values of the 17-ketosteroids, which indicate the degree of activity of the interstitial tissue, are normal (KLINEFELTER *et al.*[6]; MCCULLAGH *et al.*[7]).

Since the tubular epithelium is under control of the follicle-stimulating hormone (FSH), it is evident that if it actually elaborates a hormone which can influence the gonadotrophic activity of the hypophysis, this hormone production will depend upon the quantity of circulating FSH. On the basis of this assumption I have tested the gonadotrophic activity of the pituitary of male rats treated with: (a) large doses of follicle-stimulating hormone and (b) large doses of luteinizing (JCSH) hormone. The action of the two hormones has been controlled by determining for the former the increase of the weight of the testes, and for the latter the increase of both the prostate and the seminal vesicles. The hypertrophy of the interstitial tissue surely has no appreciable influence upon the testis weight.

The pituitaries of the donors were transplanted into the peritoneal cavity of immature female rats aged 30 days (2 pituitaries per recipient). The right ovary of the latter was removed and weighed at the moment of transplantation. After 72 hours the recipients were sacrified and their left ovary was weighed. The difference, which indicates the increase of ovarian weight following the pituitary transplantation, was taken as an index of the gonadotrophic activity of the donors. All the weighings were performed on pieces previously fixed for 48 hours in 5% formalin, liberated from the connective tissue and carefully wiped with filter paper; all the values reported indicate also the relationship between the weight of the organ under examination and the animal's body weight multiplied by 10^6. The follicle-stimulating hormone used was the gonadotrophin from pregnant mare serum ("PMS" supplied by Burrough's, Wellcome and Co. Laboratories, London[1]); the luteinizing hormone was chorionic gonadotrophin ("Lutormon" from the Burrough's, Wellcome and Co., London Laboratories; and Progon from the Istituto Sieroterapico Milanese). The animals treated (immature male rats 35–40 days old) received daily doses of 60 I.U. of PMS for 3 days or 22 I.U. of chorionic gonadotrophin per day respectively, and were sacrified 96 hours after the first injection.

Table I

Effect of PMS and of chorionic gonadotrophin on the testes and the accessories weight as well as on the gonadotrophic activity of the pituitary of immature male rats, compared to the values considered = 100 in normal animals.

Treatment	No. of animals	Testis weight	Accessories weight	Gonadotrophic activity
Controls	30	100	100	100
3×60 I.U. of PMS .	36	142	158	13
Castrated+ 3×60 I.U. of PMS .	20	—	—	95
3×22 I.U. of chorionic gonadotrophin	22	112	197	72

Table I shows that the follicle stimulating hormone in the quantities employed brings about a decrease in the gonadotrophin content of the pituitary, which can reach 87%; such action fails to be produced in castrated animals. The chorionic gonadotrophin on its turn has a much less effect, since the gonadotrophic hormones, after treatment of the animal, undergo only a 28% decrease. This decrease in gonadotrophin content is proportional to the increase of the testes weight and not of the accessories.

From these findings a conclusion can be drawn which is in favour of the hypothesis that the spermiogenetic tissue produces a hormone which is active upon the anterior pituitary. Since the serum gonadotrophin in itself does not possess any anti-pituitary action (see results with castrated donors), the latter is evidently due to the germinal epithelium: in fact the androgen production (as proved by the weight increase of the accessories) which is obtained with PMS (and which depends upon the luteinizing action of this hormone) cannot be responsible for the inactivation of the hypophysis, because a much higher quantity of androgens, such as that produced under the chorionic gonadotrophin stimulation, shows very little, if any, activity. On the other hand the decrease in gonadotrophic activity caused by chorionic gonadotrophin may be rather due to the modest development of the tubules (as proved by the slight increase in the testis weight) than to the androgens produced. These results indicate that in all probability also in normal conditions the pituitary secretion is regulated by the testis and does not depend on the level of circulating gonadotrophins; moreover, they allow us to suggest that also in males the FSH must play a very important role, contrary to what has been supposed by SIMPSON and EVANS[2].

[1] J. C. MOTTRAM and W. CRAMER, Quart. J. exper. Physiol. *13*, 209 (1923).

[2] E. WITSCHI, W. T. LEVINE, and R. T. HILL, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *29*, 1024 (1932).

[3] R. L. JOHNSTON, Endocrinol. *18*, 123 (1934).

[4] W. SCHOELLER, M. DOHRN, and W. HOHLWEG, Klin. Wschr. *15*, 1907 (1936).

[5] R. T. FRANK and U. J. SALMON, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *35*, 493 (1936).

[6] H. S. KLINEFELTER, E. C. REIFENSTEIN, and F. ALBRIGHT, J. Clin Endocrinol. *2*, 615 (1942).

[7] E. P. MCCULLAGH, R. W. SCHNEIDER, W. BOWMAN, and M. B. SMITH, J. Clin. Endocrinol. *8*, 275 (1948).

[1] It will be kept in mind that this hormone has also a luteinizing action.

[2] M. E. SIMPSON and H. M. EVANS, Endocrinol. *39*, 281 (1946).

Concerning the type of hormone which is produced in the spermiogenetic tissue, many possibilities have been proposed: McCullagh[1] and McCullagh and Walsh[2] claim they have extracted from the testis a hydrosoluble substance which can inhibit the hypophyseal castration picture without influencing the accessories. Their findings, however, have not been confirmed. Törnblom[3] claims he has isolated from the testis a substance which has the biological properties of estradiol and which is responsible for the anti-pituitary action; in fact the testes produce estrogens, probably within the Sertoli cells (Witschi and Mengert[4]), and in certain animals such production is very abundant.

Nothing positive can so far be stated, on the nature of this hormone. Paolo Schlechter

Istituto di Patologia generale dell'Università di Bologna, 1 agosto 1950.

Zusammenfassung

Das Gonadotrophin aus dem Serum trächtiger Stuten, in hohen Dosen verabreicht, inaktiviert die Hypophyse der unreifen männlichen Ratte. Eine solche Inaktivierung findet nur in Anwesenheit der Testes statt. Sie geht der Entwicklung des samenbildenden Gewebes, nicht aber der Androgenproduktion parallel. Das choriogene Gonadotrophin ist in diesem Sinne sehr wenig aktiv. Diese Tatsachen sprechen für die Existenz eines Hormons mit antihypophysärer Wirkung, welches im samenbildenden Gewebe entstehen könnte.

[1] D. R. McCullagh, Science *76*, 19 (1932).
[2] D. R. McCullagh and E. L. Walsh, Endocrinol. *19*, 422 (1935).
[3] N. Törnblom, cited in: H. E. Nieburgs, *Hormones in clinical practice* (Cassel, London, 1949), p. 181.
[4] E. Witschi and W. F. Mengert, J. Clin. Endocrinol. *2*, 279 (1942).

Effetto del 17-Idrossi 11-Deidrocorticosterone (Cortisone) sulla Granulomatosi coccidioide sperimentale

Nella letteratura più recente viene segnalato che il 17-idrossi 11-deidrocorticosterone (composto E di Kendall) (Cortisone) inibisce il tessuto di granulazione che si forma nei normali processi di guarigione delle ferite (Ragan e coll.[1]); nostre ricerche ancora inedite confermano ampiamente questi dati. È noto che il composto E agisce in senso inibitore sui fenomeni allergici (Fischel[2]). Altri Autori riferiscono che l'ormone surrenale ha la proprietà di risvegliare nell'animale da esperimento infezioni latenti pseudotubercolari (Angerer e Antopol[3]).

Questi diversi fatti fanno pensare che il composto E possa modificare il decorso e l'evoluzione di infezioni croniche, in special modo di quelle in cui sono particolarmente cimentate le difese locali del tessuto. Per questo abbiamo ritenuto interessante studiare l'effetto del composto E su un'infezione sperimentale specifica, precisamente sulla granulomatosi coccidioide, comparativamente all'effetto di altri steroidi ad azione corticoide, quali l'acetato di 11-desossicorticosterone (DCA) e il 21-acetossi pregnenolone (Artisone).

Il *Coccidioides immitis* Stiles è un fungo patogeno obbligato dell'uomo e degli animali, agente eziologico della granulomatosi coccidioide, rara malattia delle Americhe («Valley o Desert fever»), clinicamente ed anatomicamente affine alla tubercolosi polmonare. Il fungo presenta un doppio ciclo vitale, culturale e parassitario; in fase parassitaria si presenta in forma di zoosporangi e zoospore, che risvegliano nei tessuti dell'ospite una reazione granulomatosa con varia componente essudativo-necrotica.

Ratti maschi adulti, tenuti nelle stesse condizioni alimentari ed ambientali, sono stati inoculati sottocute con sospensioni 1:10 in soluzione fisiologica di patina culturale di *Coccidioides immitis* nella quantità di 1 cm³ per animale (culture su agar glucosato incubate a 37°C per 5 giorni).

Gli esperimenti sono stati condotti su quattro gruppi di cinque animali ciascuno; un gruppo di controllo e tre gruppi trattati rispettivamente con Cortisone (Ciba), DCA (Farmitalia) e Artisone (Farmitalia), in dose di 5 mg al giorno per animale, iniziando il trattamento tre giorni prima dell'inoculazione del fungo e continuandolo quindi per 15 giorni fino al sacrificio dell'animale.

Nei ratti di controllo si è notato nella sede di inoculazione del fungo una neoformazione granulomatosa a limiti netti, più o meno voluminosa: istologicamente è stata accertata la presenza di un tessuto di granulazione esuberante, disposto in formazioni nodulari, con larga partecipazione di cellule epitelioidi e giganti, ricco di fibroblasti; scarse zoospore del fungo, in varia fase regressiva, erano presenti al centro dei granulomi. In nessuno degli animali si è avuta una generalizzazione della forma morbosa.

Negli animali trattati con DCA o Artisone si è notata una più larga partecipazione di polimorfi neutrofili ed eosinofili in sede di granuloma, una certa prevalenza di zone necrotiche insieme ad una maggiore vegetazione fungina. Anche in questi animali l'episodio morboso è rimasto circoscritto al punto d'inoculazione del fungo.

I reperti più dimostrativi si sono avuti negli animali trattati con Cortisone. Oltre ad una costante e forte diminuzione del peso corporeo, in tutti gli animali si è osservato nel punto di innesto del fungo un'infiltrazione di dimensioni piuttosto limitate, a limiti imprecisi, istologicamente costituita in prevalenza assoluta da polimorfi neutrofili in varia fase regressiva e da estese zone necrotiche, praticamente priva di una reazione istiale e senza alcuna reazione demarcante fibroblastica; nelle zone necrotiche essudative il fungo si è riscontrato in forte quantità in forma di sporangi. In tre casi su cinque si è avuta una generalizzazione della forma morbosa con localizzazioni del fungo, istologicamente accertate, in sede polmonare e splenica.

I reperti nel loro insieme permettono di affermare che il Cortisone ha un potente effetto inibitore sulla formazione locale di tessuto di granulazione specifico; un effetto analogo, ma di gran lunga più modesto, pare posseggano anche il DCA e l'Artisone.

Per il Cortisone si deve inoltre ammettere un'influenza negativa sui processi generali di difesa verso le infezioni; nelle nostre esperienze viene sottolineata la possibilità di una diffusione a distanza di una malattia infettiva che di norma rimane circoscritta al punto di inoculazione. Questo fa pensare che sotto l'azione ormonale si abbia una caduta dei comuni meccanismi di difesa antiinfettiva, in analogia con i reperti già noti sull'effetto antiallergico dell'ormone.

P. Redaelli, C. Cavallero, M. Borasi, G. Sala e A. Amira

Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Milano e Laboratorio Ricerche Farmitalia di Milano, 15 luglio, 1950.

[1] C. Ragan e coll., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. *72*, 718 (1949).
[2] E. E. Fischel, Bull. New York Acad. Med. *26*, 255 (1950).
[3] H. H. Angerer e W. Antopol, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. *73*, 262 (1950).

Summary

The effect of 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone (Cortisone), 11-desoxycorticosterone (DCA), 21-acetoxy-pregnenolone (Artisone) on experimental Coccidioidal granuloma of the Rat has been investigated.

While in controls, in DCA- and Artisone-treated animals the infection remained localized, 3 out of 5 Cortisone-treated rats presented a diffusion of the pathological process to the spleen and the lungs. Histologically: in the control animals there was a profuse growth of all elements of new connective tissue; in the DCA- and Artisone-treated rats a slight reduction of connective elements was observed; in Cortisone-treated rats the production of connective elements was strongly inhibited.

Färbung der Hartsubstanzen von Zähnen durch vitale Reduktion von Tetrazoliumchlorid

Die Frage nach der Existenz eines Stoffwechsels in den Hartsubstanzen der Zähne, besonders im Zahnschmelz, ist zwar praktisch und theoretisch bedeutungsvoll, jedoch methodisch sehr schwer anzugehen. Die in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen mit radioaktiven Elementen[1] haben *in vivo* den Einbau radioaktiven Phosphats erwiesen. Sollte es sich hierbei um aktive Prozesse handeln[2], so dürfte man auf die Existenz eines organischen Stoffwechsels schließen, welcher den Wechsel anorganischer Substanz trägt.

Zur direkten Messung des Stoffwechsels – etwa mit der manometrischen Technik – ist das Objekt wegen seiner harten Konsistenz, dem geringen Ausmaß der zu erwartenden Umsätze und der Gefahr einer Täuschung durch eingeschleppte Bakterien wenig geeignet. Wir haben aus diesem Grunde Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (TTC), den von Kuhn und Jerchel[3] eingeführten Redoxindikator, in künstlich angelegten Kavitäten an Zähnen von Hunden *in vivo* appliziert. Die Substanz wurde in Breiform unter Abschluß mit Zinnfolie und Verschlußzement steril eingelagert und 2–3 Tage bis zur Extraktion belassen.

Unsere Ergebnisse zeigen Färbungen sowohl des Dentins wie auch des Zahnschmelzes durch die rote, wasserunlösliche, reduzierte Form des Indikators.

Die Färbung des *Dentins* ist schwach bis leuchtend rot und zeigt eine diffuse, teils flecken- und streifenartige Verteilung mit Anreicherungen in den Dentinkanälchen, jedoch keine Kristalle von Formazan. In einigen Fällen zeigte der Bereich der in ihrer Kontinuität durch die Kavitätenpräparation unterbrochenen Dentinkanälchen keine Rotfärbung, obwohl sie dem eingelagerten Indikator unmittelbar benachbart waren. Der darüberliegende Schmelz ist wieder rot gefärbt.

Zur besseren Wiedergabe der Befunde ist eine Abbildung beigefügt.

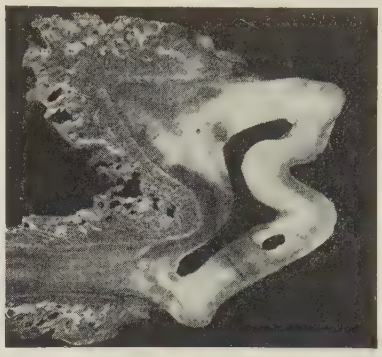
Die Färbung des *Schmelzes* ist weniger ausgedehnt und schwächer als diejenige des Dentins. Sie war in einigen Fällen nicht deutlich zu erkennen. Sie ist vor allem in der Schmelzaußenwand und in der interprismatischen Substanz lokalisiert.

[1] Zusammenfassung bei: E. Wannenmacher, Dtsch. Zahnärztl. Z. *2*, 925 (1949).

[2] Auch getötete Zahnsubstanz zeigt in gewissem Umfange Austausch von P_{32} (G. Johannsen, M. Falkenheim und H. C. Hodge, J. Biol. Chem. *159*, 129 [1945]).

[3] R. Kuhn und D. Jerchel, Ber. dtsch. Chem. Ges. *74*, 949 (1941).

Die Pulpa läßt dunkelrote, körnchenartige Ausfällungen von Formazan erkennen. Die Odontoblasten sind stark gefärbt. Auch der *Zement* färbt sich rot.



Längsschliff eines nach dreitägiger lokaler Applikation von TTC entfernten Hundebackenzahnes. Kavität ist als ovales Loch erkennbar. Aufnahme im grünen Licht. Die rotgefärbten Zonen erscheinen als graue Schatten. – Vergrößerung 1:1,5.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß in den Hartsubstanzen der Zähne Stoffe zugegen sind, welche ein beträchtlich negatives Redoxpotential[1] besitzen. Ob man aus dieser Tatsache auf Stoffwechsel schließen kann und ob die Lokalisation dieser Stoffwechselprozesse mit der gewählten Methodik zuverlässig ist, bedarf weiterer Versuche, welche eingeleitet sind. Wir werden an anderer Stelle ausführlich auf die Problematik eingehen.

Herrn Dr. Meyer-Ahrend vom Pathologischen Institut des Universitätskrankenhauses Eppendorf danken wir für die Anfertigung des in der Abbildung gezeigten Photogramms sowie für die Erörterung unserer Versuchsergebnisse.

Theodor Bücher und Volker Krüger

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Hamburg und Zahnärztliche Klinik des Allgemeinen Krankenhauses Barmbeck, den 10. September 1950.

Summary

The metabolism of the hard tissue of teeth has been examined with the redox-indicator tetrazolium-chloride. The colourless solution was topically applied to living teeth of dogs and was reduced there—in the dentin more than in the enamel—to red formazan. The results make it probable, that there are some substances of a metabolism present, which cause the reduction.

[1] D. Jerchel und W. Möhle, Ber. dtsch. Chem. Ges. *77*, 591 (1944).

Zur Frage einer selektiven Ultraschallwirkung auf die Cochlear- und Aktionspotentiale des Innenohres

Die bei Schalleinwirkung von der Schnecke ableitbare «electric response» (Wever-Bray-Effekt) ist eine Resultierende aus zwei verschiedenen bioelektrischen Phänomenen, der kurz als Cochlearpotentiale (CP) bezeichneten «microphonic action of the cochlea» (Adrian[1]) und den Aktionspotentialen (AP) des primären akustischen Neurons (Saul und Davis[2]). Entsprechend ihrem

[1] E. D. Adrian, J. Physiol. *71*, XXVIII (1931).

[2] L. S. Saul und H. Davis, Arch. Neurol. and Psychiat. *28*, 1104 (1932).

verschiedenen Ursprung zeigen beide Phänomene gegenüber Änderungen von Frequenz und Intensität des Schallreizes ein verschiedenes Verhalten, aus dem u.a. auf die Latenzzeit der AP geschlossen werden kann (Bornschein und Krejci)[1]. Eine Trennung wurde irreversibel mit Chinin (Davis, Gernandt und Riesco-McClure[2]) und reversibel durch Hypoxie (Bornschein und Gernandt[3]) bewirkt, indem die AP diesen Einflüssen gegenüber empfindlicher sind als die CP. Eine Möglichkeit zur selektiven Auslöschung der CP unter Erhaltung der AP, für die Klärung der noch immer unbekannten funktionellen Zusammenhänge von entscheidender Bedeutung, konnte bisher nicht gefunden werden. Die bereits früher mitgeteilte[4] hochgradige Reduktion der CP als Folge intensiver Ultraschalleinwirkung legte entsprechende Paralleluntersuchungen von CP und AP nahe.

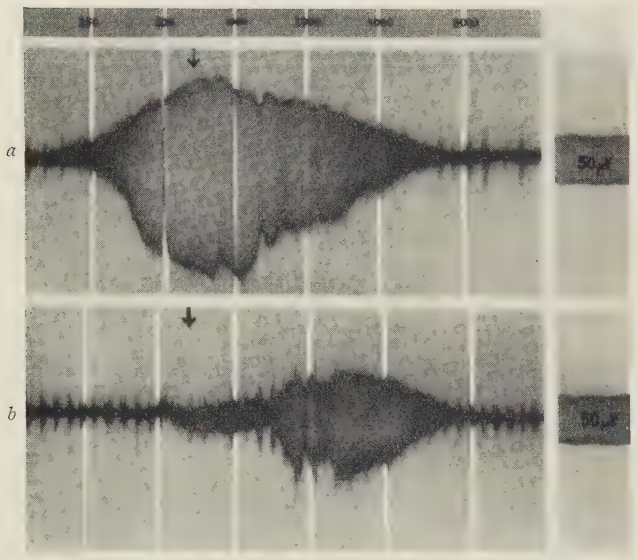


Abb. 1. Elektrocochleogramme von M 224, linkes Ohr: Ableitung von der basalen Schneckenwindung; Reizton von 125 auf 16000 Hz ansteigend; Eichung (rechts): Wechselstrom 50 Hz, 50 μV; *a* Kontrollaufnahme; *b* nach isolierter Beschallung der Schneckenspitze mit Ultraschallbündel von 1 mm Durchmesser (800 kHz, 0,6 W/cm^2, 1 min). Bei der mit ↓ bezeichneten Frequenz (690 Hz) wurden die in Abb. 2 dargestellten Detailbilder aufgenommen. (Die regelmäßig wiederkehrenden Zacken sind Artefakte, durch motorische Unruhe des Versuchstieres bedingt.)

Als Versuchstiere dienten 5 Meerschweinchen (400 bis 600 g) in nicht zu tiefer Urethannarkose (1,5 g/kg). Durch Eröffnung der Bulla und des Hypotympanons wurden bei beiden Ohren Schneckenbasis und -spitze freigelegt. In den Knochen der basalen Windung wurde nach der von Davis und Mitarbeiter[5] angegebenen Methode ein feiner Silberdraht als Elektrode eingeführt und mit Dentalzement fixiert. Einzelheiten über die vierstufige Verstärkung, die akustische Reizung und die Registrierung des sogenannten Elektrocochleogramms mittels Kathodenstrahloszillograph und Photokymographion sind früheren Veröffentlichungen zu entnehmen. Neben der erwähnten Hüllkurvenregistrierung, die ein Integral der jeweiligen Potentialfläche liefert, wurden Detailbilder des Potentialverlaufes aufgenommen (Contax 1:2, Vorsatzlinse 20 cm, Fluorapidfilm; Nachbeschleunigung des Kathodenstrahls mit 1 kV). Der verwendete Ultraschall besaß eine Frequenz von 800 kHz (Apparatur der Firma F. Reiner, Wien). Durch eine geeignete Vorrichtung am Schwingungskörper wurde ein Ultraschallbündel von 1 mm Durchmesser ausgeblendet und damit im jeweiligen Versuch die Schneckenspitze direkt beschallt. Bei jedem der 10 untersuchten Ohren wurden unmittelbar vor und nach einer 1 Minute andauernden Ultraschalleinwirkung verschiedener Intensität (0,3–2,4 W/cm^2) je ein Elektrocochleogramm und überdies bei bestimmten Frequenzen unterhalb von 1000 Hz, bei welchen die AP im resultierenden Kurvenbild am deutlichsten sichtbar waren, Detailbilder aufgenommen.

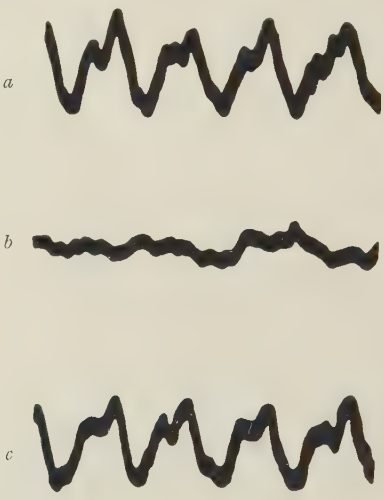


Abb. 2. Detailaufnahmen (Potentialverlauf) zu Abb. 1: *a* Kontrollaufnahme; Reizton 690 Hz, $2{,}4 \cdot 10^{-2}$ μbar (– 34 db); *b* nach Ultraschalleinwirkung, gleicher Reizton wie bei *a*; *c* nach Ultraschalleinwirkung, Reizton 690 Hz, $2{,}4 \cdot 10^{-1}$ μbar (– 14 db). (Die Angaben in db beziehen sich auf die zur Aufnahme der Elektrocochleogramme [Abb. 1] verwendete Lautstärke.)

Die auf die Schneckenspitze isolierte Ultraschalleinwirkung bewirkte in allen Fällen eine Reduktion der CP, die bei Intensitäten bis etwa 0,6 W/cm^2 ausschließlich die unteren Frequenzen betraf und für den Frequenzbereich 500–1000 Hz bis zu 20 db betrug (Abb. 1). Die AP, bei schwellennaher Reizung als «hump» in der von den CP beherrschten Potentialkurve sichtbar (Abb. 2*a*), waren unter den gleichen Bedingungen nach der Ultraschalleinwirkung ebensowenig wie die CP aus dem Störspiegel der Potentialkurve zu differenzieren (Abb. 2*b*). Nach Wiederherstellung der ursprünglichen CP-Amplitude durch kompensatorische Erhöhung der Reizstärke kehrten auch die AP in ihrer ursprünglichen Form wieder (Abb. 2*c*). Ein entsprechendes Verhalten der AP fand sich auch bei höheren Ultraschallintensitäten, die aus Gründen, welche an anderer Stelle näher erörtert werden sollen, von durchaus komplexer Wirkung auf die CP und deren Frequenzabhängigkeit waren. Intensitäten über 1,5 W/cm^2 führten zu komplettem Schwund von CP und AP.

Das in allen Fällen parallele Verhalten von CP und AP, vor allem hinsichtlich der Kompensationsmöglichkeit von Potentialverlusten, kann bei der grundsätzlichen Verschiedenheit der verantwortlichen anatomischen Substrate kaum mit einer zufällig gleichen Emp-

[1] H. Bornschein und F. Krejci, Exper. *6*, 354 (1950).

[2] H. Davis, B. E. Gernandt und J. S. Riesco-McClure, J. Neurophysiol. *13*, 73 (1950).

[3] H. Bornschein und B. E. Gernandt, Acta physiol. scand. *21*, 82 (1950).

[4] F. Krejci, Intern. Kongr. Ultraschall, Rom 1950.

[5] H. Davis, B. E. Gernandt, J. S. Riesco-McClure und W. P. Covell, J. Acoust. Soc. Amer. *21*, 502 (1949).

findlichkeit erklärt werden. Es spricht vielmehr für eine selektive Schädigung des im Rezeptorensystem lokalisierten Generators der CP durch Ultraschall und einen sekundären Schwund der nervösen AP, bedingt durch den Ausfall einer entsprechenden Erregungsübertragung. Dies bedeutet eine neuerliche Bestätigung der Anschauung, wonach die CP als Ausdruck einer Funktion aufzufassen sind, die direkt oder indirekt zur Auslösung der nervösen Erregung führt, mögen die CP dabei mit dieser Funktion identisch sein oder lediglich ihre Begleiterscheinung darstellen. H. Bornschein und F. Krejci

Physiologisches Institut der Universität Wien und I. Universitätsklinik für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfkrankheiten Wien, den 25. Juli 1950.

Summary

The effect of ultrasonics (800,000 c/s, 0·3–2·4 W/cm²; beam of 1 mm diameter applied directly on the apex of the cochlea) on the electrical response of the inner ear was investigated in guinea pigs. The results obtained in ten experiments indicate, that ultrasonics cause a selective diminuation of the cochlear microphonics and a consequent secondary depression of the action potentials.

PRO LABORATORIO

Eine einfache und empfindliche Methode zur biologischen Histaminbestimmung in kleinen Flüssigkeitsmengen[1]

Wenn man mit der bekannten Histaminbestimmungsmethode am isolierten Meerschweinchendarm sehr kleine Mengen Histamin erfassen will, so wählt man die Cüvetten so klein als möglich. In verschiedenen Laboratorien hat man diese Technik bereits weit getrieben. Cüvetten von nur 1 ml Inhalt sind heute nichts Außergewöhnliches mehr.

Bekanntlich ist es jedoch nicht ganz einfach, mit solchen Mikro-Cüvetten einwandfrei zu arbeiten. Wir haben daher ein anderes Verfahren entworfen, welches *einerseits erlaubt, mit noch kleineren Mengen auszukommen – nämlich mit 0,2 ml – ohne andererseits die Unannehmlichkeit der schwierigen Handhabung mit sich zu bringen.* Das Verfahren besteht darin, daß man die Histaminlösung von der Innenseite des Darmes einwirken läßt, sie gewissermaßen in den Darm einfüllt. Da nun aber bekanntlich (Feigen und Campbell[2]) der Darm nur dann gut histaminempfindlich ist, wenn das Histamin von der Serosa-Seite einwirkt, muß man die Darmstückchen vorher «umkehren» (wie einen Handschuh) und damit ihre Serosa-Seite nach innen bringen.

Soviel über das Prinzipielle. Das Arbeiten *in praxi* ist einfach. Es soll an Hand der Abb. 1 kurz beschrieben werden:

Der Darm wird den durch Nackenschlag getöteten Meerschweinchen in gewohnter Weise entnommen, sorgfältig gespült und in Stücke von 2 bis 3 cm Länge geschnitten. Anschließend wird jedes einzelne Stückchen sorgfältig «umgestülpt», dann in Tyrodelösung für mindestens 2 Stunden im Kühlschrank gehalten und schließlich zum Gebrauch wieder *langsam* auf die Arbeitstemperatur von 38 Grad gebracht.

[1] Herrn Prof. Dr. med. H. Staub zum 60. Geburtstag.

[2] G. A. Feigen and D. H. Campbell, Amer. J. Physiol. *145*, 676 (1946).

Das umgekehrte Darmstückchen wird dann an einem Ende wie ein Schlauch auf das Kapillarrohr «K» gebunden; am anderen, freien Ende ist in üblicher Weise ein passendes Registriersystem befestigt. Dann wird das

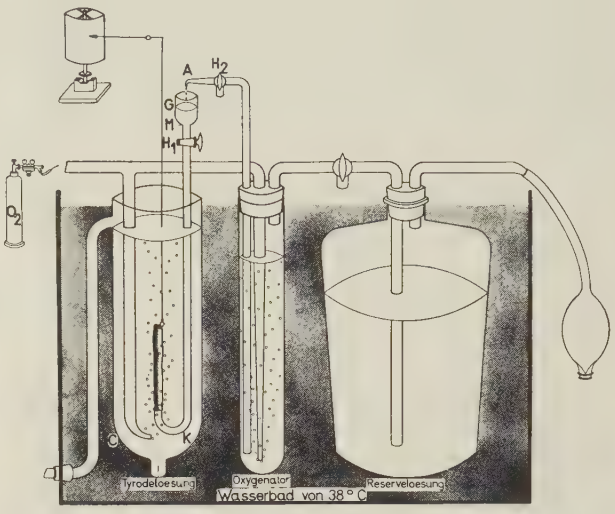


Abb. 1

Ganze in eine Cüvette «C» gebracht, welche mit Sauerstoff gesättigte Tyrodelösung enthält und im übrigen beliebig groß sein kann (sie faßt in unserem Falle etwa 50 ml). *Wichtig ist nun, daß der Darm auch auf seiner Innen-(Serosa-)Seite dauernd mit sauerstoffgesättigter Tyrodelösung[1] durchströmt wird.* Dies wird dadurch erreicht, daß aus dem Oxygenator «O» durch den einströmenden Sauerstoff ständig Tyrodelösung durch «A» ausgetrieben wird, nach dem Gefäß «G» gelangt und von dort bei offenem Hahn «H_1» unter konstantem Druck in den Darm einfließt. Durch «A» soll mehr Tyrode geliefert

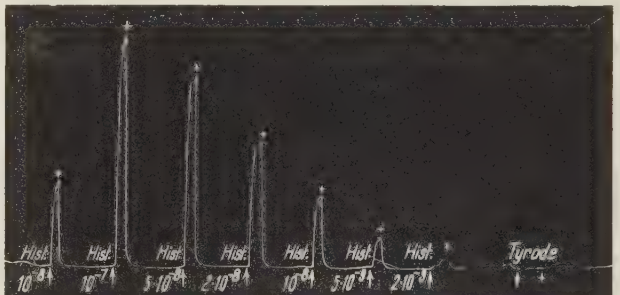


Abb. 2. + = Spülen; bei *N* wurde Tyrode allein zugegeben (nach dem für die Zugabe der Histaminlösungen üblichen Procedere [siehe Text]).

werden, als durch den Darm fließen kann; dann ist der Einflußdruck konstant. Er entspricht dann – unter Vernachlässigung des Widerstandes des Darmrohres – der Niveaudifferenz zwischen dem freien Rande von «G» und dem Flüssigkeitsspiegel in C. Diese soll so groß sein (ca. 5 cm), daß pro Minute etwa 3 bis 5 ml durch den Darm fließen. Bei sehr viel stärkerem Durchfluß erschlafft der Darm eventuell nicht vollständig.

Soll nun Histamin zugegeben werden, so wird zunächst durch entsprechendes Drehen von «H_2» der Nachschub von Tyrode aus «A» gestoppt. Sobald «G» bis zur Marke «M» ausgelaufen ist, wird durch entsprechendes Drehen

[1] Enthaltend Atropinsulfat in Konz. $2 \cdot 10^{-8}$.

von «H_1» das weitere Leerlaufen von «K» verhindert. Jetzt wird die zu prüfende, auf 38 Grad vorgewärmte Lösung in «G» (welches 0,2 ml faßt) eingefüllt und durch Drehen von «H_1» in den Darm eingelassen. Die 0,2 ml Lösung genügen, um das 3 cm lange Darmstück zu füllen. Von Zeit zu Zeit soll – nach dem gleichen Procedere wie für eine Histaminlösung – der Effekt von bloßer Tyrode «getestet» werden; der Darm soll hierauf natürlich nicht reagieren.

Abb. 2 zeigt an einem Beispiel, wie die Methode praktisch arbeitet.

Histaminempfindlichkeit des isolierten Meerschweinchendarms in vitro
(Mittelwerte aus je 4 Darmstückchen)

Tier Nr.	Neue Methode	Alte Methode
1	$2{,}5 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-8}$
3	$7{,}5 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-11}$
4	$1 \cdot 10^{-9}$	$7{,}5 \cdot 10^{-11}$
5	$6 \cdot 10^{-10}$	$3{,}5 \cdot 10^{-10}$
8	$1 \cdot 10^{-9}$	$2{,}5 \cdot 10^{-9}$
10	$1{,}5 \cdot 10^{-10}$	$1{,}5 \cdot 10^{-9}$
11	$2 \cdot 10^{-9}$	$7{,}5 \cdot 10^{-10}$
12	$2 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
13	$5 \cdot 10^{-10}$	$3{,}5 \cdot 10^{-9}$
15	$6 \cdot 10^{-10}$	$6 \cdot 10^{-10}$
16	$1 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-9}$
17	$3{,}5 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
18	$1 \cdot 10^{-9}$	$3{,}5 \cdot 10^{-9}$
19	$7{,}5 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
20	$1{,}5 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
21	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9}$
22	$3{,}5 \cdot 10^{-9}$	$3{,}5 \cdot 10^{-10}$
23	$7{,}5 \cdot 10^{-10}$	$7{,}5 \cdot 10^{-10}$
24	$2 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$
25	$2 \cdot 10^{-10}$	$2 \cdot 10^{-9}$
26	$5 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-9}$
27	$1 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
28	$8{,}5 \cdot 10^{-10}$	$2{,}5 \cdot 10^{-9}$
29	$1 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-9}$
30	$2 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$
31	$5 \cdot 10^{-10}$	$1{,}5 \cdot 10^{-9}$
32	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$
33	$3{,}5 \cdot 10^{-10}$	$7{,}5 \cdot 10^{-10}$
34	$3{,}5 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$
35	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$
36	$5 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9}$
37	$5 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
38	$5 \cdot 10^{-10}$	$2 \cdot 10^{-9}$
39	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9}$
40	$1{,}5 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9}$
41	$2 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$
42	$1 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-9}$
43	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-9}$
Mittel:	$1{,}94 \cdot 10^{-9}$	$2{,}18 \cdot 10^{-9}$

Die Testlösung wird so lange im Darm belassen, bis die Kontraktur ihr Maximum erreicht hat (was nach ca. 15 bis längstens 30 Sekunden der Fall ist). Dann wird durch entsprechendes Drehen der Hahnen H_2 und H_1 wieder auf kontinuierliche Perfusion mit Tyrode umgestellt. Würde man mit der Tyrodeperfusion länger zuwarten, so würde als Folge der zunehmenden Diffusion der Testlösung aus dem Darm in die Cüvette die Kontraktur des Darmes mehr und mehr nachlassen. Es ist wichtig, daß, nachdem die normale Perfusion mit Tyrode einmal abgestellt ist, mit dem Einfließenlassen der Testlösung nicht zu lange gewartet wird, damit ein empfindlicher Darm nicht etwa den Wiederbeginn des Einfließens schon als Reiz empfindet.

Der Hauptvorteil des Verfahrens – das Arbeiten mit nur 0,2 ml Lösung – wird natürlich nur dann entsprechend zur Geltung kommen können, wenn die Därme trotz der veränderten Methodik ihre normale Histaminempfindlichkeit beibehalten, jedenfalls aber nicht weniger empfindlich werden. Um über diesen Punkt Aufschluß zu bekommen, haben wir an 38 Meerschweinchen die Histaminempfindlichkeit der Därme *gleichzeitig nach der alten und nach der neuen Methode* bestimmt. Als Maß für die Empfindlichkeit haben wir diejenige minimale Histaminkonzentration gewählt, welche gerade noch eine gut meßbare Kontraktion hervorruft (d. h. in unserem Falle einen Ausschlag von ca. 5 mm auf der Kurve). Zur Bestimmung wurden von jedem Tier 8 Darmstückchen entnommen und je deren 4 für die alte bzw. neue Methode verwendet. Die Resultate sind in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt. Man ersieht daraus, daß die Histaminempfindlichkeit der Därme bei der neuen Methode gleich ist wie bei der alten. Der Vorteil des kleinen Volumens wird daher voll zum Ausdruck kommen können. Unsere bisherige Erfahrung hat gezeigt, daß die neue Methode sich praktisch zur Testierung unbekannter Histaminlösungen gut bewährt. Es dauert jedoch im allgemeinen etwas länger, bis der Darm nach dem Aufbinden auf das Kapillarrohr die zur Testierung notwendige Konstanz der Histaminempfindlichkeit erreicht hat. Nachher jedoch benötigt die eigentliche Testierung nicht mehr Zeit als bei der alten Methode.

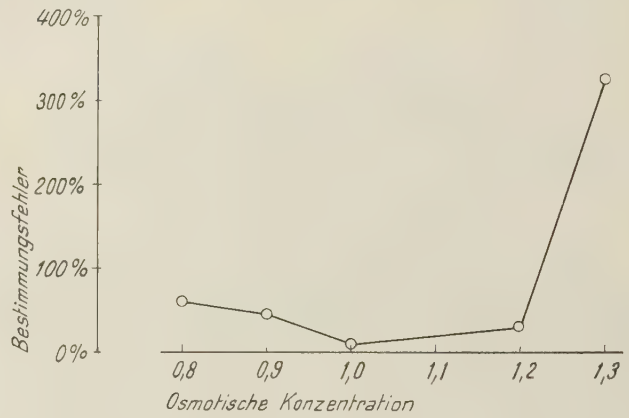


Abb. 3. Ordinate: Genauigkeit der Bestimmung einer Histaminlösung unbekannter Konzentration. (Angegeben ist die durchschnittliche Abweichung von je 12 Versuchen, bei bloß zweimaligem Zusetzen jeder Testlösung, in ± Prozenten des effektiven Wertes.) Abszisse: Osmotische Konzentration der unbekannten Histaminlösung (Normaltyrode = 1,0).

Bei Testierungen von histaminhaltigen Extrakten stellt sich immer wieder die Frage, wieviel man zugeben darf, ohne daß durch den Extrakt als solchen die Reaktionsfähigkeit des Darmes alteriert wird. Als mögliche Ursachen für eine solche Alteration kommen vor allem in Frage eine Änderung in der Ionenzusammensetzung der Lösung und dann eine Änderung in der osmotischen Konzentration als Ganzes. Um über den letzteren der beiden Punkte einigermaßen Aufschluß zu bekommen, haben wir geprüft, mit welcher Genauigkeit unbekannte Histaminlösungen bestimmt werden können, wenn sie in «Tyrode» *verschiedener Konzentration* verabreicht werden. Zur Verwendung kamen Normaltyrode (= 1,0-Tyrode), dann verdünnte Tyrode (0,9 und 0,8) sowie auch konzentriertere Tyrode (1,2 und 1,3). In Abb. 3 ist graphisch aufgetragen, wie die Genauigkeit der Bestimmung durch Änderung der osmotischen Konzentration der unbekannten Histaminlösung beeinflußt wird. Man ersieht daraus, daß eine Abweichung der osmotischen Konzentration von ± 20% die Genauigkeit der Histaminbestimmung noch nicht wesentlich beeinträchtigt. Nach dem Kurvenverlauf zu schließen, scheinen Abweichungen in Richtung einer

Hypo-osmose die Bestimmungen weniger zu beeinträchtigen als solche in Richtung einer Hyperosmose.

KARL BUCHER

Pharmakologische Anstalt der Universität Basel, den 25. Oktober 1950.

Summary

A simple method for the determination of histamine—using inverted pieces of isolated guinea pig intestine—is described, whereby amounts as small as 0,2 ml of solution may be employed. The difference between this and other methods is that the solution is merely filled into the lumen of the inverted intestine instead of—as is generally done—bringing the solution into contact with it from the exterior. Since the response and sensitivity of the intestine towards histamine are not impaired by this technique, the determination of histamine in much smaller amounts of fluids than hitherto possible is now assured.

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Das Polarisationsmikroskop

Eine Einführung in die mikroskopische Untersuchungsmethodik durchsichtiger kristalliner Stoffe für Mineralogen, Petrographen, Chemiker und Naturwissenschaftler im allgemeinen

Von CONRAD BURRI
308 Seiten mit 168 Figuren und 3 Tafeln
(Verlag Birkhäuser, Basel 1950) (Fr. 32.80)

Im allgemeinen wird man feststellen müssen, daß die mikroskopischen Untersuchungsmethoden des Mineralogen trotz ihrer diagnostischen Ergiebigkeit leider nach wie vor verhältnismäßig schwer Eingang in andere Disziplinen finden. Freilich ist bei diesen vorwiegend auf *Kristalloptik* beruhenden Verfahren mit Merkregeln, fertigen Rezepten und «reiner Anschauung» nicht durchzukommen. Und da in den großen einführenden Physikvorlesungen die Kristalloptik meistens etwas stiefmütterlich als eine Art Anhängsel – oft nur an Hand eines einzigen willigen Paradepferdes (nämlich des optisch einachsigen Kalzits) – demonstriert wird, da andererseits ihre umfassenden, klassischen Darstellungen für die meisten Nichtphysiker undurchdringlich sind, so muß einer Einführung in die in Rede stehenden Methoden also fast immer eine, wenn auch elementar gehaltene, so doch gründliche Behandlung der theoretischen Unterlagen vorausgehen. Damit aber der Arbeitsaufwand in einem günstigen Verhältnis zum Ertrag stehe, soll der sich so redlich Bemühende dann auch in den Genuß der ganzen Vielfalt von Anwendungsmöglichkeiten kommen und auch die moderneren, zum Teil durch große Eleganz und Sicherheit ausgezeichneten Meßverfahren kennenlernen.

Dem Verfasser, der sich auf diesem Gebiet offensichtlich reicher Unterrichtserfahrung erfreut, ist es gelungen, die sich damit ergebenden Aufgaben glücklich aufeinander abzustimmen und nicht nur den Bedürfnissen der Fachmineralogen, sondern auch der Chemiker, Technologen, Biologen usw. in vieler Hinsicht gerecht zu werden. Er schließt so eine zweifellos schon lange bestehende Lücke im Schrifttum.

Das Fundament wird sehr sorgfältig gelegt. Dabei ist besonders zu begrüßen, daß ohne Rücksicht auf die Bequemlichkeit des Weges stets vom Allgemeinfall ausgegangen wird. Durch Beschränkung auf das wirklich Benötigte wird trotzdem eine Ausweitung vermieden. Dem Polarisationsmikroskop selbst nebst Zubehör ist ein Abschnitt von 40 Seiten gewidmet. Der methodische Teil ist bewußt stark auf die Untersuchung von Körnerpräparaten zugeschnitten; die für den Petrographen im Vordergrund stehende Dünnschliffuntersuchung scheint dem Referenten doch fast zu wenig berücksichtigt. Da andererseits überwiegend auf mineralische Beispiele (Feldspäte, Pyroxene, Hornblenden, Glimmer, Olivin) zurückgegriffen wird, entsteht eine gelinde Diskrepanz. Besonders liebevoll wird auf die in den letzten Jahrzehnten so gut ausgebauten, durch Variationen von λ und T verfeinerten Immersions-, sowie auf die Drehtischverfahren eingegangen. Eine Zusammenstellung kristallographischer und kristalloptischer Werke, sowie solcher mit kristalloptischen Datensammlungen findet sich nach dem ersten einführenden Abschnitt über die Natur des Lichtes; spezielle Literaturhinweise als Fußnoten im Text.

Das in allen Stücken sorgfältig ausgearbeitete Werk ist mit instruktiven Abbildungen reich ausgestattet und durch einige wichtige kristalloptische Diagramme vervollständigt. Es verspricht auch dem Fachmineralogen ein wertvolles Hilfsmittel zu werden. E. BAIER

Fortschritte der Alkaloidchemie seit 1933

Von HANS G. BOIT
Fr. 58.30
Akademie-Verlag, Berlin 1950
425 Seiten

Das Buch von BOIT soll eine Fortsetzung der Alkaloidzusammenstellungen in ABDERHALDENS *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* darstellen. Es steht aber qualitativ weiter über den früheren Kompilationen; es ist außerordentlich straff geschrieben und behandelt fast ausschließlich den Chemismus der Alkaloide. Die Herkunft des Verfassers aus der Schule von HERMANN LEUCHS (dessen Andenken das Buch gewidmet ist), bringt es mit sich, daß die Strychninchemie besonders eingehend geschildert wird, aber auch die andern Gebiete der Alkaloidchemie sind knapp und klar wiedergegeben. Für den Chemiker, der sich ausschließlich für die Strukturchemie der Alkaloide interessiert, ist das Buch von BOIT eine sehr wertvolle Arbeit. Der Aufbau des Werkes ist der in der Alkaloidchemie übliche, die Literaturzitate sind sehr vollständig, außerdem besitzt das Buch ein ausgezeichnetes Sachregister.

E. SCHLITTLER

Elemente der Botanik

Eine Anleitung zum Studium der Pflanze durch Beobachtungen und Versuche an Crepis capillaris (L.) Wallr.

Von E. Heitz

158 Seiten mit 107 Originalabbildungen
(Springer-Verlag, Wien 1950)
(geh. Fr. 19.50, geb. Fr. 22.–)

Die vorliegende Anleitung unternimmt den originellen Versuch, die wichtigen Probleme der Botanik durch einfache Experimente an einer einzigen Pflanzenart abzuleiten. Die Versuchspflanze ist *Crepis capillaris*, die leicht aufgezogen werden kann und als raschwüchsige Annuelle entsprechend dem Verlaufe dieses Praktikumskurses Keimlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel, Blüten und Samen liefert. Die Untersuchung geschieht mit den denkbar einfachsten Hilfsmitteln (Mikroskop, Präparierbesteck und einigen Glasschalen). Die morphologischen Betrachtungen gehen von den Besonderheiten der Ligulifloren aus, zu welcher Unterfamilie der Kompositen *Crepis* gehört. Versuche über Keimung, Guttation, Transpiration, Wasserleitungsgeschwindigkeit, Bewegung der Spaltöffnungen, Atmung ,Assimilation, Stoffspeicherung, Wachstumsmessungen, Befruchtung, Embryobildung, periodische Bewegungen usw. führen in die Physiologie ein. Die Anatomie kommt mit möglichst wenig Schneidetechnik aus, da die jungen Organe der Versuchspflanze durchsichtig sind und die Lebendbeobachtung in den Vordergrund gestellt wird. Alle Abschnitte sind mit neuen, erstmalig publizierten Bildern illustriert, die den Naturbeobachter zum genauen Zeichnen und Photographieren anregen.

Den besonderen Reiz dieses Buches bildet der Vorstoß mit den erwähnten einfachen Mitteln in die Zytologie. Dank des vom Verfasser in die Botanik eingeführten Färbequetschverfahrens und der geringen Chromosomenzahl der *Crepis capillaris* ($2n = 6$) ist es möglich, ohne Mikrotom, teilweise sogar ohne Immersionsobjektiv, Chromosomenmorphologie zu treiben. Eine so elegante Einführung in die Kernzytologie ist in keinem anderen Praktikum zu finden; sie wird den Anfänger ermuntern, sich tiefer in dieses wichtige Forschungsgebiet einzuarbeiten, auf dem der Verfasser Hervorragendes geleistet hat. Diese anregende Anleitung kann daher allen angehenden und unterrichtenden Botanikern aufs wärmste empfohlen werden. A. Frey-Wyssling

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

EXPLICATIONES

Über die Inkonsequenz unserer Zeitrechnung

Zu Beginn des Jahres 1950 wurde, nicht allein in der Tagespresse, sondern – zumindest implizit – auch in den Geleitworten zu wissenschaftlichen Werken und Zeitschriften, ein alter Streit erneut aufgerollt, hier in der Form der Behauptung, daß es der letzte Jahrgang der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts sei, dort mit der Feststellung, die zweite Hälfte des Jahrhunderts habe begonnen. Derartige Ausführungen lassen erkennen, daß die Inkonsequenz, die in der heutigen bürgerlichen Zeitrechnung steckt, noch nicht in die allgemeinen Erfahrungsgrundlagen der wissenschaftlichen Autoren übergegangen ist. Wir sagten «allgemeine Erfahrungsgrundlagen»; denn die ins Auge gefaßte Tatsache ist so fest und vielfältig in allen Geisteswissenschaften und in den Gepflogenheiten des täglichen Lebens verankert, daß sie schwerlich anders denn als Erfahrungsgrundlage hingenommen werden kann; trotz allem Widerspruch, der gegen sie wegen der darin steckenden Fehlzuordnung erhoben werden mag. Für uns handelt es sich hier darum, die Inkonsequenz als solche klar zu erkennen, um ein für allemal ein fehlerhaftes Handhaben des Maßsystems der uns überkommenen Zeitrechnung auszuschließen.

Wie alle Untersuchungen eines Systems in der Nähe des Nullwertes einer bestimmten Eigenschaft besonders aufschlußreich sind, so zeigt sich auch hier, daß eine Untersuchung des bürgerlichen Zeitmaßes in der Nähe des Nullpunktes den Aufbau des Systems besonders deutlich zu erkennen gibt. Wir wollen deshalb für die folgenden Überlegungen einen Zeitpunkt herausgreifen, der in dem viele Jahrtausende umfassenden Bereich nur wenige Sekunden vom Nullpunkt der Zählung absteht. Für einen beliebig dort angesetzten Punkt bringt untenstehende Tabelle eine Übersicht der verschiedenen zeitlichen Registrierungsmöglichkeiten, einerseits in Form der Grundzahlen der gebräuchlichen Zeiteinheiten, anderseits in Gestalt der Ordnungszahlen derselben Einheiten und vergleicht diese mit den zugeordneten Zahlenwerten der bürgerlichen Zeitrechnung (Tab. S. 115).

Die Nähe des Nullpunktes des Systems läßt das Bildungsgesetz der bürgerlichen Zeitrechnung klar zutage treten. Zur Registrierung eines Zeitpunktes in Sekunden, Minuten und Stunden dienen die Grundzahlen; zur Kennzeichnung der beiden nächst höheren Zeiteinheiten – die in Verbindung mit der Jahreszahl das sogenannte Datum ausmachen – benützt man die Ordnungszahlen; die Jahre, Jahrzehnte, Jahrhunderte usw. werden in Grundzahlen registriert, wobei jedoch inkonsequenterweise zur Ordnungszahl 1 (= erstes Jahr!) nicht die Grundzahl 0, sondern die Grundzahl 1 als zugehörig angesehen wird. Diese Durchbrechung der Zuordnung erfolgt nur auf der Stelle der Einer; bei den Zehnern, Hundertern und Tausendern wird der Ordnungszahl 1 die Grundzahl 0 zugeschrieben[1].

[1] Ein Teil der Schwierigkeiten verschwindet, wenn man die höheren Zeiteinheiten (Jahrzehnt, Jahrhundert, ...) nicht gelten läßt, sondern jede Jahreszahl als fortlaufend durchgezählte Ordnungszahl auffaßt. Damit erkennt man dem ersten Jahr nach Christus die Grundzahl (plus) Null, dem ersten Jahr vor Christus die Grundzahl (minus) Null zu. Über das Rechnen mit zwei Nulljahren vgl. weiter unten auf dieser Seite.

Der Lateiner registriert bekanntlich die Jahre nach Ordnungszahlen: anno millesimo ... usw. Die in allen modernen Kultursprachen vorhandene Inkonsequenz der Zeitregistrierung verschwindet demnach dort. Das Rechnen mit Ordnungszahlen bringt freilich eine gewisse Schwerfälligkeit gegenüber einem Rechnen mit Grundzahlen.

Beispiel für die Darstellung desselben Zeitpunktes in verschiedenen Ordnungssystemen der gebräuchlichen Zeiteinheiten

Zeitpunkt festgelegt durch		
die Grundzahlen	die Ordnungszahlen	das bürgerliche System
Es seien vergangen	es liegt also vor	was registriert wird
5,1 Sekunden	die 6. Sekunde der	5,1 Sekunden
0 Minuten	1. Minute der	0 Minuten
0 Stunden	1. Stunde des	0 Stunden
0 Tage	1. Tages des	1. Tag
0 Monate	1. Monats des	1. Monat (Januar)
0 Jahre	1. Jahres des	Jahr 1
0 Jahrzehnte	1. Jahrzehnts des	Jahrzehnt[1] 0
0 Jahrhunderte	1. Jahrhunderts des	Jahrhundert[1] 0
0 Jahrtausende	1. Jahrtausends	Jahrtausend[1] 0

[1] Es ist üblich, diese Nullen nicht mitzuschleppen. Man schreibt einfach im Jahre 54 n.Chr. Das ist klar und unmißverständlich. Doch darf man nicht übersehen, daß dies nur eine *Abkürzung* für die strengere Schreibweise im Jahre 0054 darstellt. Die beiden Nullen sowie der Fünfer sind Grundzahlen, die Vier aber ist Ordnungszahl! Man erkennt dies ohne weiteres, wenn man sich vergegenwärtigt, daß das Jahr 54 im sechsten Jahrzehnt nach Christus gelegen ist; dennoch schreiben wir ihm die Zehnerzahl Fünf zu. Analoges gilt für die Hunderter und Tausender, nicht jedoch für die Einer.

Die aufgezeigte Fehlzuordnung in unserer Zeitrechnung ist der Grund dafür, daß beispielsweise der erste Band der Annalen der Physik, der im 20. Jahrhundert erschien, nicht der des Jahres 1900, sondern der des Jahres 1901 ist. Analog ist zu verstehen, daß man um des Fehlens eines Nulljahres willen die Jahreszahlen vor Christi Geburt nicht einfach zu denen nach Christus addieren kann, sondern die Summe der Jahreszahlen um 1 Einheit erniedrigen muß, um die Zahl der Jahre des betrachteten Zeitraumes zu erhalten.

Grundsätzlich ist der Gedanke nicht von der Hand zu weisen, daß es strenggenommen je ein Nulljahr mit positivem und mit negativem Vorzeichen geben müßte. Setzt man beispielsweise zwei Maßstäbe mit den Nullmarken aneinander, so hat man ja auch ein positives und ein negatives Nullintervall zu berücksichtigen. Doch da den Unterteilungen des Längenmaßes mit wachsendem Abstand vom Nullpunkt nach *beiden* Richtungen hin höhere Zahlenwerte zukommen, während beim Zeitmaß die Unterteilungen (Datumangaben) stets in *derselben* Richtung weiterlaufend gezählt werden, so kann man sich, ohne einen Gedankenkurzschluß befürchten zu müssen, auch darauf einigen, nur *ein* (zweckmäßig als positiv anzusehendes) Nulljahr zu verwenden.

Dadurch entsteht zwar eine unsymmetrische Anordnung der Zeitskalen. Denn die Mitte des Jahres 10 *vor* Christus beispielsweise liegt hierbei 9½ Jahre vom Nullpunkt der Zeitrechnung entfernt, während die Mitte des Jahres 10 *nach* Christus 10½ Jahre hiervon absteht. Anderseits ergibt bei dieser Festlegung der Zeitskalen die Summe der Jahreszahlen vor und nach Christi Geburt unmittelbar den dazwischenliegenden Zeitraum (9½ + 10½ = 20 Jahre), was bei einer Verabredung von zwei Nulljahren nicht der Fall wäre. Bleibt man sich der Unsymmetrie der Skalenanordnung bewußt, so ist die Rechnung mit einem Nulljahr an Stelle von zweien wohl die näherliegende. Vgl. hierzu das Schema auf Seite 116, rechts.

Recht witzig ist es übrigens, daß man bei kühner Ignorierung solcher auch den Nullpunkt der «Goldenen-Zahl»-Zyklen festlegenden Rechenkorrekturen zu einer erstaunlich einfachen Gleichung für das Alter des Mondes – der Lichtphase nach[1] – am 1. Januar eines jeden Jahres (der sogenannten «Epakte neuen Stiles») kommt.

[1] Vom vorausgehenden Neumond an gerechnet.

Diese Formel für die Epakte (gültig für den Zeitraum zwischen 1900 und 2199) lautet:

$$\text{Alter (in Tagen)} = (\text{Jahreszahl} - 19\,n) \cdot 11 - 30\,m - 1, \qquad (1)$$

wobei n und m die größte *ganze* Zahl bedeuten, bei der die angegebene Gleichung noch nicht negativ wird. Die Eins am Schluß der Formel ist die Säkularkorrektur für den erwähnten Zeitraum. An ihre Stelle tritt zwischen 1700 und 1899 die Zahl Null.

Zugleich mit der Epakte sind bekanntlich die Mondphasen für das ganze betrachtete Jahr festgelegt. Am i-ten Tag des Jahres ist das Alter des Mondes größer als das durch die Epakte festgelegte, und zwar um den Betrag:

$$\Delta A = i - 29{,}5\,k, \qquad (2)$$

wobei k (ähnlich wie oben die Faktoren n und m) die größte ganze Zahl bedeutet, die den Ausdruck eben noch nichtnegativ werden läßt[1].

[1] Die Parameter dieser Gleichungen haben folgenden physikalischen Sinn: Die Zahl 19 rührt daher, daß alle 19 Jahre die Phasen des (zyklischen) Mondes auf denselben Jahrestag fallen (sogenannter «Metonzyklus»; siehe Fußnote 1, S. 115). Die Abweichung hiervon beträgt innerhalb eines solchen Zyklus 2 Stunden 5 Minuten, wächst also in rund 219 Jahren auf einen Tag an. Daher rührt im wesentlichen die Säkularkorrektur der Formel.

Die Zahl 11 ergibt sich als Differenz zwischen dem 12 Monate umfassenden sogenannten «festen» Mondjahr zu 354 bzw. 355 Tagen und dem Sonnenjahr zu 365 bzw. 366 Tagen.

Der Parameter 30 stellt den Näherungswert für die Dauer des synodischen Mondumlaufes dar. Der genauere Wert ist 29,5 [siehe Gleichung (2)], doch werden mit diesem Wert die Abweichungen, die von den übrigen Parametern in Gleichung (1) herrühren, weniger gut kompensiert als von dem um eine halbe Einheit höheren Wert.

Die numerischen Werte für n, m und k erhält man dadurch, daß man die vorgelegten Werte der Gleichung durch die als Faktoren mit n bzw. m und k verbundenen Parameter dividiert. Der physikalische Sinn dieser Rechenoperation ist, daß die Zahl der ganzzahligen Mondzyklen auf diese Weise eliminiert wird.

Beide Gleichungen sind, wie schon aus der Begründung der Parameter folgt, Näherungsformeln. Doch erweisen sie sich als äußerst bequem für orientierende Rechnungen. Sie sind übrigens bisher noch nirgends erwähnt. Dies hängt vermutlich damit zusammen, daß man bislang bei derartigen Betrachtungen stets die Registrierung nach der «Goldenen Zahl» in den Vordergrund stellte, deren Zählung, mit dem Jahr 1 v.Chr. beginnend, festliegt. Vgl. hierzu etwa: H. Grotefend, *Taschenbuch der Zeitrechnung* (Hannover 1943), oder den

Wie elementar mit diesen Formeln die Berechnung der Mondphasen wird, sieht man am schnellsten an einem Beispiel.

Angenommen, wir wollen für den 2. Februar 1951 die Stellung des Mondes zur Sonne wissen. In Gleichung (1) ist dann für die Jahreszahl der Wert 1951 zu setzen. Da nur ganze Zahlen, die keine negative Lösung ergeben, zugelassen sind, so folgt: 1951 : 19 = 102, Rest 13; dieser mit 11 multipliziert liefert 143; dividiert durch 30 ergibt 4, Rest 23. Davon die Säkularkorrektur abgezogen, ergibt 22.

Am 1. Januar 1951 muß demnach der Mond 22 Tage alt sein und am 2. Februar, 33 Tage später, laut Gleichung (2) (da 33 : 29,5 = 1, Rest 3½) weitere 3½ Tage älter. Zum vorgegebenen Datum ist mithin der Mond 25½ Tage alt; es sind noch 4 Tage bis Neumond, die abnehmende Mondsichel kulminiert rund 3½ Stunden vor der Sonne.

Wie die aufgezeigte Inkonsequenz in unserer Zeitrechnung entstanden ist, läßt sich leicht rekonstruieren. Bei der Festlegung der christlichen Zeitrechnung waren sich die Gelehrten offensichtlich einig, daß es ein Jahr Null nicht geben kann. Argumentierte doch noch zu Beginn des Jahres 1950 in einer bekannten süddeutschen Zeitung ein Professor (ob er wohl einen Lehrstuhl für Philosophie innehat?) etwa so: «Ein Seiendes, dem die Bezeichnung Null zukommt, kann nicht existieren. Denn die Null drückt aus, daß der betrachtete Gegenstand als nicht vorhanden angesehen werden soll. Da aber ein gegebenes Jahr keinesfalls als nicht existierend angesprochen werden kann, kann es logischerweise niemals mit Null bezeichnet werden.»

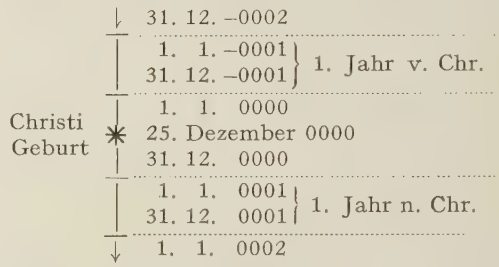
Wäre diese Argumentation zwingend, so dürfte es auch nie 0 Uhr 5 Sekunden sein, sondern höchstens 12 Uhr bzw. 24 Uhr und 5 Sekunden.

Eine weitere Diskrepanz kommt hinzu: Wir können kein Jahr angeben, das als «Jahr der Geburt Christi» bezeichnet werden könnte, ohne mit einer zur *Contradictio in adiecto* werdenden Identitätserklärung eines *anno ante* bzw. *post Christum natum* behaftet zu sein. Daß das Jahr der Geburt Christi nicht zugleich ein Jahr vor (oder auch nach) seiner Geburt sein kann, hätte eigentlich schon die christlichen Kalenderreformatoren veranlassen können, ein eigenes Jahr der Geburt Christi anzusetzen. Dies wäre nichts anderes als das schon oben postulierte Nulljahr.

Doch haben sich, um das ominöse Nulljahr mit Sicherheit zu vermeiden, die Kalenderreformatoren offensichtlich ausgedacht, Christus müsse genau um Mitternacht zwischen den Jahren 1 vor und 1 nach Christi Geburt geboren sein, so daß es ein Jahr, in dem Christus geboren wurde, grundsätzlich nicht gibt. Wir wollen hier nicht mit philosophischen Argumentationen arbeiten und daraus folgern: Ein Ereignis, das in einem Jahre stattfand, das es nicht gibt, kann logischerweise niemals stattgefunden haben; sondern wollen mit einer derartigen Beweisführung nur den Gedankenkurzschluß der Gegner des Nulljahres herausstellen.

Daß das *historische* Ereignis der Geburt Christi mit dem als Nullpunkt der Zeitrechnung angesetzten *Datum* der Geburt Christi nicht übereinstimmt, spielt für diese Überlegungen keine Rolle. Die Definition des Nullpunktes der Zeitrechnung kann auf alle Fälle in freier Vereinbarung erfolgen. Man hat denn auch später das Datum der Geburt Christi auf den 25. Dezember «amtlich» vorverlegt[1], während hinsichtlich der Jahreszahl des historischen Ereignisses eine Übereinstimmung bislang immer noch nicht erzielt werden konnte.

Unter diesen etwas verworrenen Verhältnissen scheint ein Vorschlag meines Kollegen E. Moritz, dem ich die Anregung zu untenstehender Skizze danke, ernstlicher Beachtung wert. Er meinte, wenn die Historiker sich



Schema zur Behebung der bisherigen Fehlzuordnung.

entschließen könnten, die Jahreszahlen vor Christi Geburt um eine Einheit zu erniedrigen, so wäre alles in schönster Ordnung. Dies trifft den Kern der Sache. Das derzeitige Jahr 1 vor Christi würde so zum fehlenden Nulljahr, während die Zählung der Jahre nach Christus unverändert bliebe. Nun stimmen die Differenzen der Jahre vor und nach Christus mit ihrem numerischen Wert überein, das konventionell festgelegte Datum der Geburt Christi braucht nicht mehr auf ein Jahr vor oder nach seiner Geburt geschoben zu werden, gleichzeitig ist die inkonsequente Vermischung von Ordnungs- und Grundzahlen in unserer heutigen Zeitrechnung beseitigt.

Aber selbst wenn die Historiker sich sträuben, die aufgezeigte Problematik in unserer Zeitrechnung zu tilgen, so können wir uns doch darauf berufen, daß, soweit die Geschichtsschreibung zurückreicht, der Anfang eines neuen Jahrhunderts stets mit dem 31. 12. bzw. dem Weihnachtsfest des Jahres *n*-Hundertundneunundneunzig gefeiert wurde. Diese Tatsache berechtigt uns zweifelsohne, die kommende Jahrtausendwende am 31. 12. 1999 zu feiern, auch wenn das fehlende Nulljahr bis dahin amtlich noch nicht legitimiert sein sollte. F. Ender

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Heidelberg, den 14. Oktober 1950.

Summary

The designation of time in the Christian era is examined. We meet with some incompatibilities. It is explained how these inconsistencies arise and how they can be removed.

By ignoring zero of an era based on the so-called Meton cycles (19 Julian years = 235 lunations) we obtain a surprisingly simple relation—as yet unknown—for calculating the lunar phases for any date of the civil calendar to a good approximation.

Artikel von A. Kopff im «*Astronomischen Kalender*» (Heidelberg 1947).

Nachtrag bei der Korrektur: U. Baehr (Badische Landessternwarte Heidelberg-Königstuhl) hatte die Freundlichkeit, die astronomisch-mathematische Literatur im Hinblick auf das Vorkommen einer derartigen Gleichung zu revidieren. Danach findet sich, bislang unbeachtet, eine der obigen Gleichung (1) verwandte, jedoch merklich kompliziertere Beziehung zur Berechnung der Jahresepakte in C. F. Gauss' Werke, herausgegeben von der Gesellschaft der Wissenschaft in Göttingen, Bd. 6, 1. Teil, S. 219.

Die Gleichung lautet:

$$E = \frac{R}{30}\left(53 + \frac{11\,RA}{19} - M\right);$$

wobei die Größen A, M und R durch zusätzliche Gleichungen errechnet werden müssen. Hingegen entfällt eine explizite Säkularkorrektur.

[1] Vgl. F. K. Ginzel, *Handbuch der mathematischen und technischen Chronologie* (3 Bde.), Leipzig (1906–1914).

STUDIORUM PROGRESSUS

Über ein neuartiges, selektives Aphizid mit Tiefenwirkung[1]

Von R. Wiesmann, R. Gasser und H. Grob

Blattläuse oder Aphiden spielen als Pflanzenschädlinge, ganz besonders aber als Virusüberträger, eine bedeutende Rolle, deren regelmäßige Bekämpfung daher in vielen Kulturen zu den wichtigsten Maßnahmen gehört.

Die Mittel zur Bekämpfung der Blattläuse haben in den letzten Jahren bedeutende Verbesserungen erfahren. Die Wirkung der Nikotinpräparate wurde durch Erhöhung ihrer Netzkraft gesteigert, und es wurden auf der Basis der sogenannten Phosphorsäureester neue Blattlausmittel mit beachtlicher Tiefenwirkung entwickelt (vgl. Frohberger[2], Unterstenhöfer[3]).

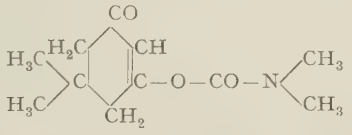
Dem Nikotin und besonders den Phosphorsäureestern haften Nachteile an. Wegen Ihrer Giftigkeit für Warmblüter machen sie besondere Vorsichtsmaßnahmen im Gebrauch notwendig. Weiter erfaßt man mit ihnen nicht nur die Aphiden, sondern in hohem Maße auch deren natürliche Feinde, Schlupfwespen, Syrphiden, Coccinelliden usw., und beeinträchtigt dadurch die Biocoenose.

Es gelang uns, ein Blattlausmittel zu entwickeln, das sich durch Ungiftigkeit, Selektivität und Tiefenwirkung auszeichnet.

I. *Angaben über Konstitution und physikalische Eigenschaften des neuen Aphizides*

Die Wirksubstanz des neuen Aphizids wurde von Dr. H. Gysin, Chemiker der J. R. Geigy AG., Basel, erstmals synthetisiert und trägt die interne Nummer 19258 (im folgenden mit 19258 bezeichnet).

19258 ist ein *Urethan*, und zwar das 5,5-Dimethyldihydroresorcindimethylcarbamat mit der Konstitutionsformel:



Die Substanz war neu, und ihre insektiziden Eigenschaften wurden erstmals durch uns festgestellt.

Der Schmelzpunkt des gelb-kristallinen, technischen Rohproduktes liegt bei 43–45°C. Aus Cyclohexan umkristallisiert, läßt sich die Substanz in farblosen Kristallen vom Schmelzpunkt 45–46°C erhalten. 19258 ist in Wasser bei 20°C zu 3,15% und in den meisten organischen Lösungsmitteln, wie Alkohol, Aceton, Äther, leicht, in Petrol, Cyclohexan und Petroläther mäßig löslich. Die hydro- und lipophilen Eigenschaften der Substanz dürften für ihre insektizide sowie ihre Tiefenwirkung bei der Pflanze von wesentlicher Bedeutung sein.

[1] Forschungslaboratorien für Schädlingsbekämpfung der J. R. Geigy AG., Basel, den 1. November 1950.

[2] P. E. Frohberger, *Untersuchungen über das Verhalten des Insektizids Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat* (E 605) *auf und in der Pflanze*, Inaug.-Diss. Universität Köln, 1949.

[3] G. Unterstenhöfer, *Über den gegenwärtigen Stand der inneren Therapie der Pflanze*. Zeitschrift Pflanzenkrankh. *57*, 272 (1950).

II. *Toxizität*

19258 ist im Vergleich mit Nikotin und den Phosphorsäureestern, z.B. dem Diäthyl-*p*-nitrophenyl-thiophosphat (Parathion) weitgehend ungiftig. Die DL 50 für Ratten und Mäuse beträgt nach den Angaben von Prof. Dr. Domenjoz (J. R. Geigy AG., Basel) für 19258 per os rund 150 mg/kg, bewegt sich also in ähnlichen Grenzen wie die DDT-Wirksubstanz (175–280 mg/kg)[1]. Für Reinnikotin wird die DL 50 bei den gleichen Versuchstieren mit 20 mg/kg und für das Parathion mit 5–8 mg/kg angegeben. Die perkutane Resorption der Substanz ist äußerst gering, ebenfalls im Gegensatz namentlich zu den Phosphorsäureestern, die durch die Haut sehr leicht resorbiert werden. Bei der Anwendung der zum Aphizid aufgearbeiteten Substanz 19258 sind daher keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten.

III. *Allgemeine insektizide Eigenschaften des 19258*

Je nach Insektenart und Konzentration ist die neue Substanz sowohl als Fraßmittel als auch im Kontakt mehr oder weniger stark insektizid.

1. *Fraßwirkung.* – Lepidopterenraupen, Blattiden und Koleopteren ertragen Futter mit starken Gaben von 19258 behandelt, täglich bis zu 20 mg (gleich ca. 2–5 g/kg) verabfolgt, ohne Schaden. Die Substanz geht eigentümlicherweise zum größten Teil unverdaut mit dem Kote ab. Nikotin und Parathion dem Futter beigegeben, töten diese Tiere bereits bei einmaligen Mengen von 0,1 bis 0,05 mg pro Tier. Hier wird die Substanz vom Darmepithel resorbiert.

Eine Anzahl anderer Insekten können dagegen, wie aus Tabelle I hervorgeht, mit 19258 auch *per os* vergiftet werden. Zum Vergleich seien auch die Ergebnisse angeführt, die mit Parathion-Reinsubstanz erhalten wurden[2].

Tabelle I

Tierart	DL 50 für 19258		DL 50 f. Parathion	
	pro Tier	pro kg	pro Tier	pro kg
Plusia gamma . .	10 γ	30 mg	2,5 γ	7,5 mg
Apis mellifica. . .	1–1,5 γ	13 mg	0,1 γ	1 mg
Musca domestica .	0,05-0,07 γ	3,2 mg	0,01 γ	0,5 mg
Ephestia kühniella .	0,005 γ	0,5 mg	0,01 γ	1 mg
Aphis rumicis. . .	0,0005 γ	0,8 mg	0,0005 γ	0,8 mg

Allgemein gesehen ist Parathion für die verglichenen Insekten zum Teil giftiger, zum Teil ungefähr gleich giftig wie 19258.

Bei 19258 tritt die Giftwirkung in der Regel 3–8mal rascher in Erscheinung als beim verglichenen Phosphorsäureester, was möglicherweise mit der großen Wasser- und Lipoidlöslichkeit unserer Substanz in Zusammenhang steht.

Je nach Tierart sind die für die DL 50 nötigen Giftmengen verschieden groß. Auffallend ist die relativ große Empfindlichkeit der Aphiden, die bei beiden Stoffen ca. 0,8 mg/kg beträgt.

[1] P. Müller, R. Domenjoz, R. Wiesmann und A. Buxtorf, Erg. Hyg. Bakt., Immunitätsforsch. u. exp. Therapie *26*, 34 (1949).

[2] Aus biologischen Gründen konnten wir zu diesen Versuchen nur Insekten verwenden, die ohne weiteres gesüßte Giftlösung zu sich nahmen. Versuche mit anderen Insekten ergaben unbefriedigende Resultate.

2. *Kontaktwirkung.* – Die Kontaktwirkung der Substanz ist je nach Insektenart bei unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden. Mit hohen Substanzmengen, z.B. 10 mg/100 cm² Glasfläche, können Fliegen, Ameisen, Küchenschaben, Zecken usw. rasch abgetötet werden, während niedrigere Gaben, bereits 1 und 0,1 mg/100 cm², beim Dauerkontakt unwirksam werden. Eine Ausnahme macht *Musca domestica*, die noch bei 0,1 mg/100 cm² innert relativ kurzer Zeit in Rückenlage gebracht wird. Auch hier sind wiederum die *Aphiden* sehr empfindlich. Selbst bei Substanzmengen von 0,001 mg/100 cm² gelingt es, *Aphis rumicis* innert einigen Stunden zu töten. *Aphis fabae* benötigt hiezu 0,005 mg/100 cm². Die gleichen Versuche mit den Phosphorsäureestern, z.B. Parathion, durchgeführt, zeigen, daß dieselben beim tarsalen Kontakt selbst bei Substanzmengen von 0,01 bis 0,005 mg/100 cm² Glasfläche für die angeführten Labortiere noch wirksam sind. Die Phosphorsäureester sind also tarsal aufgenommen viel giftiger und breiter wirkend als das 19258.

Die neue Substanz ist ein prädestiniertes Aphizid, das *per os* und tarsal aufgenommen bei Blattläusen in sehr kleinen Mengen noch wirkt. Die meisten andern Insekten dagegen werden erst mit 10–1000mal größeren Substanzmengen vernichtet. Dies ist der Grund dafür, daß das 19258 bei hoher aphizider Wirkung selektiv wirkt.

3. *Die Vergiftungserscheinungen bei Insekten.* – Nach einer mehr oder weniger langen Latenzzeit, je nach Aufnahme des Giftes und Empfindlichkeit des Insektes, zeigen die Tiere eine schwache Aufregung. Es treten Beinlähmungen, ein und ein koordiniertes Gehen wird unmöglich. Die Tiere fallen auf den Rücken und zeigen nun einen ganz eigenartigen Beintremor, den man am besten als Tetanus oder Strecktremor bezeichnen kann. In regelmäßigen, kurzen Intervallen führen alle Extremitäten zusammen einen starken 3–5 Sekunden dauernden Tremor aus und nehmen nachher wieder eine unverkrampfte bewegungslose Ruhelage ein. In den Ruhepausen zwischen den einzelnen Tetanuserregungen führen taktile Reize zu keinen Reaktionen.

Mit beginnender Vergiftung führen die Mundwerkzeuge und der Ösophagus konstante Bewegungen aus. Dadurch schlucken die Tiere unwillkürlich Luft und blähen sich oft derart auf, daß die Abdomensegmente und die Intersegmentalhäute maximal auseinandergetrieben werden.

Die Vergiftungserscheinungen und der *Wirkungsmechanismus* der Substanz wurden an ausgewachsenen Larven und Imagines von *Blatta americana* eingehender untersucht. Der Strecktremor der Extremitäten ist nur beim Vorhandensein eines unverletzten Reflexbogens möglich. Werden die Längskommissuren der Thorakalganglien durchschnitten oder die Thorakalsegmente isoliert, dann führen die Extremitäten den Tremor unabhängig voneinander weiter aus. Dekapitierte, unter 19258-Einwirkung stehende Küchenschaben weisen einen unveränderten Tetanus der Extremitäten auf. Am abgetrennten Kopf bewegen sich die Mundgliedmassen noch einige Zeit ununterbrochen weiter. Wird an der *Blatta* das thorakale Bauchmark freigelegt und mit wässeriger 19258-Lösung bestrichen, dann tritt an den Extremitäten sofort der Strecktremor in Erscheinung.

Injiziert man einer *Blatta* ein Gemisch von DDT-Wirksubstanz und 19258, dann zeigen die Tiere einerseits den für die DDT-Wirksubstanz typischen, kurzschlägigen Beintremor[1] und daneben aber auch den durch das 19258 induzierten Strecktremor, der in gleichen, regelmäßigen Intervallen eintritt. Da die DDT-Wirksubstanz peripher angreift[1] und einen Dauertremor erzeugt, kann das 19258 nur zentral einwirken.

19258-Injektionen haben auf die Herzfrequenz der *Blatta* praktisch keinen Einfluß, dagegen wird die Stärke des Pulsschlages etwa auf die Hälfte des normalen herabgesetzt. Die abdominalen Atembewegungen werden unter dem Einfluß des Strecktremors der Extremitäten sehr stark beschleunigt, wodurch auch eine erhöhte Wasserabgabe eintritt, die bis zum Tode der Tiere das 2–3-fache über das Normale steigt.

Stark vergiftete *Blatta* weisen einen niedrigeren p_H-Wert im Blute und den Muskeln auf. Die normalen p_H-Werte des Blutes betragen 6,9–7,0, diejenigen der Muskeln 6,7–6,8. Bei einer starken 19258-Vergiftung fallen sie kurz vor dem Tode auf 6,3 beim Blut und 6,1 bei den Muskeln. Die stärkere Azidität des Blutes und der Muskeln ist wahrscheinlich auf eine starke Milchsäureproduktion infolge des Tetanus der Extremitäten zurückzuführen. Es hat den Anschein, als ob der 19258-Tod durch Erschöpfung, verbunden mit einer Autointoxikation, eintrete.

IV. *Aphizide Eigenschaften*

Aus dem großen Versuchsmaterial kann hier nur eine kleine Auslese der beim Obst und Beerenobst erhaltenen Resultate gegeben werden. Im Verlaufe der Jahre 1949 und 1950 entwickelten wir ein Aphizid, das 10% 19258 als Aktivsubstanz aufweist.

1. *Ergebnisse, die mit dem Aphizid gegen die verschiedenen Obstbaum- und Beerenobstblattläuse erhalten wurden*

a) *Bekämpfung der Fundatrices der Apfelblattläuse.* – In der Sarvaz (Wallis) wurde am 28. März bzw. am 21. März 1950 eine größere Anzahl von Apfelbäumen vor der Blüte mit unserem Aphizid behandelt. Die Spritzbrühe enthielt 0,01 bzw. 0,02% Aktivsubstanz. An Blattläusen waren vorhanden: *Aphis pomi, Dentatus crataegi* und *Dentatus malicola.*

Durch eine Bespritzung gelang es, im Direktkontakt die Fundatrices der genannten Blattläuse restlos zu vernichten, während nach 5 Tagen an den unbehandelten Bäumen durchschnittlich 31% der Knospen mehr oder weniger große Blattlausansammlungen zeigten. Die behandelten Apfelbäume wiesen bis Ende Mai, also während zwei Monaten, keinen Neubefall auf.

b) *Bekämpfung verschiedener Blattläuse der Kern- und Steinobstbäume sowie der Beerensträucher im Sommer.* – Die Initialwirkung des neuen Aphizides wurde in einer großen Anzahl von Einzelfreilandversuchen an verschiedenen Blattlausarten studiert, um besonders die Breite der Aphizidwirkung kennenzulernen (siehe Tabelle II).

Das neue Aphizid zeitigt bei der direkten Bespritzung der Blattläuse je nach der Blattlausart gute bis sehr gute Ergebnisse. Besonders wertvoll erscheinen uns die Resultate bei der schwer bekämpfbaren Blutlaus (*Schizoneura lanigera*), die mit den bis anhin gebräuchlichen Blattlausmitteln, selbst bei Verdoppelung der Aktivsubstanzkonzentration im Spritzmittel, meist nur ungenügend erfaßt werden kann.

[1] P. Müller, R. Domenjoz, R. Wiesmann und A. Buxtorf, l.c. – R. Wiesmann, Verh. Schweiz. naturf. Ges. *126*, 166 (1946).

[1] P. Müller, R. Domenjoz, R. Wiesmann und A. Buxtorf, l.c. – R. Wiesmann, *Über einen biologischen Test zum Nachweis und zur Bestimmung von synthetischen Kontaktinsektiziden bei Bienenvergiftungen*, Z. Pflanzenkrankh. (1951), im Druck. – R. Domenjoz, Arch. int. Pharmakodyn. *73*, 128 (1946).

Tabelle II

Wirkungsbreite des neuen Aphizids gegenüber den wichtigsten Blattläusen der Obstbäume und Beerensträucher

Blattlausart	Aktivsubstanz in %	Verminderung der Blattlauspopulation in %
Aphis pomi	0,02–0,03	100
**Dysaphis communis*		94,5–100
Yezabura malifoliae		99–100
**Yezabrua piri*		99–100
**Piraphis pirinus*		100
**Myzus cerasi*		85–99,6
Hyalopterus arundinis		65–100
**Brachycaudus helychrysi*		80–100
**Cryptomyces ribis*		98
Aphis grossulariae		100
Capitophorus fragaefolii		100
Amphorophora rubi		100
Schizoneura lanigera	0,04	100

Unter den verwendeten Blattlausarten findet man eine ganze Anzahl, die gut geschützt in gerollten Blättern leben, daher mit dem Spritzmittelstrahl nicht oder nur sehr schwer getroffen werden können. Sie sind in der Tabelle mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Mit unserem neuen Aphizid gelingt es, auch diese blattrollenden Blattläuse gut bis sehr gut zu erfassen, da dieses Mittel eine recht beachtliche Tiefenwirkung aufweist.

2. *Ergebnisse mit dem Aphizid gegen Blattläuse an Gemüse und im Feldbau*

Eine große Anzahl von Versuchen wurde auch mit den Blattläusen der Gemüsepflanzen, der Kartoffeln und den Runkelrüben durchgeführt (siehe Tabelle III).

Tabelle III

Blattlausart	Aktivsubstanz in %	Verminderung der Blattlauspopulation in %
Brevicoryne brassicae	0,02–0,04	35–70
Macrosiphon pelargonii		50–60
Myzus persicae		30–70
Doralis fabae		100

Tabelle IV

Einfluß des neuen Aphizids (0,04% A.S.) auf die Insektenfauna eines mittelgroßen Apfelbaumes im Hochsommer 1949

Insekten, Arachniden	Innert 46 Stunden nach der Bespritzung heruntergefallene Tiere	Hierauf noch mit Phosphorsäureester behandelte, heruntergefallene Tiere
o *Thysanopteren*	0	1
Rhynchoten		
x Heteropteren spez.	0	6
* Anthocoriden, Imagines	3	42
* Anthocoriden, Larven	0	69
o Cicadiden	0	3
o *Aphis pomi*	317	70
o *Schizoneura lanigera*	455	42
Coleopteren		
* Coccinelliden, Imagines	0	5
* Coccinelliden, Larven	0	6
* *Scymnus*	0	1
o *Curculioniden*	2	41
x Andere Koleopteren	0	12
Hymenopteren		
* Brachypteren (*Oligotha* sp.), Imagines	0	2
* Brachypteren (*Oligotha* sp.), Larven	1	1
* Brachypteren spez.	0	3
* *Aphelinus mali*	9	40
* Ichneumoniden	0	5
* Chalcididen	0	28
* Formiciden	0	6
x Andere Hymenopteren	0	8
Dipteren		
* Syrphiden, Imagines	0	5
* Syrphiden, Larven	0	1
x Andere Dipteren, Imagines	91	152
x Andere Dipteren, Larven	2	0
* Chrysopiden, Imagines	0	7
* Chrysopiden, Larven	0	172
x Microlepidoptera	1	4
x Arachniden	0	5
o Acariden	0	5
	881	744

* Nützlinge; o Schädlinge; x indifferent

davon Nützlinge:	13 = 1,3%	723 = 54,3%
Schädlinge:	774 = 88 %	162 = 21,7%
Indifferent:	94 = 10,7%	189 = 24,0%

Die zum Teil schlechten Resultate, die auch von andern Versuchsanstellern bestätigt wurden, können wir vorerst nicht erklären. Gegen *Doralis fabae*, eine an Runkeln einen Virus übertragende Blattlaus, sind die Resultate durchschlagend. Es scheint, daß die verschiedenen Blattlausarten gegen die neue Wirksubstanz unterschiedlich reagieren, daß also auch hier eine gewisse Selektivität vorliegt.

V. *Einfluß auf Pflanzen*

Aus der in den Freilandversuchen festgestellten Tiefenwirkung sowie mit entsprechenden Laborversuchen konnte der Beweis erbracht werden, daß die Substanz 19258 im anorganischen Saftstrom der Pflanze nach oben geleitet, in den Blättern in den organischen Saftstrom übergeht und mit ihm in der ganzen Pflanze verteilt wird, wie dies auch von intraplantär wirkenden organischen Phosphorverbindungen bekannt ist[1]. Hier wird er von den Blattläusen aufgenommen[2], die *per os* auf minime Substanzmengen reagieren. Durch die Anwesenheit der Substanz 19258 in den pflanzlichen Geweben werden Wachstum und Zellteilung, Plasmabewegung, osmotische Zustandsgrößen, Atmung und Transpiration nicht verändert. Einzig bei der Kohlenstoffassimilation grüner Pflanzen und bei der alkoholischen Gärung von Hefen konnten vorübergehende Störungen beobachtet werden.

Aus diesen Beobachtungen erklärt sich, daß das 19258 für die Pflanze, auch in etwas höheren Konzentrationen als für die aphizide Wirkung notwendig, nicht schädlich ist. Am Pfirsich zum Beispiel, der auf Pflanzenschutzmittel besonders empfindlich ist, wird das neue Blattlausmittel bis zu 0,06% und an Apfel- und Birnbäumen bis zu 0,1–0,15% Aktivsubstanzgehalt schadlos ertragen.

VI. *Selektive Wirkung des Aphizids*

Über den Einfluß des Aphizids auf die Biocoenose der Apfelbäume, insbesondere auch der Nützlingsfauna derselben, gibt Tabelle IV Aufschluß. Sie stammt aus einer Vielzahl einschlägiger Untersuchungen (Tabelle IV).

Die Nützlingspopulation der Apfelbäume bleibt außer den Dipteren-Imagines, deren Eier und Larven (Syrphiden) aber unter der Behandlung nicht leiden, weitgehend geschont. Diese Spezifität der Wirkung des neuen Aphizids ist für die Erhaltung der Baumbiocoenose sehr wertvoll.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß das neue Aphizid praktisch ungiftig ist, auf Obst- und Beerenobst die Wirkung der bekannten Blattlausmittel erreicht, eine gute Tiefenwirkung aufweist, nicht phytotozid ist und wegen seiner selektiven Wirkung die Blattlausfeinde weitgehend nicht schädigt.

Summary

5,5-Dimethyldehydroresorcinol-dimethylcarbamate although only slightly toxic to warm blooded animals, has remarkable insecticidal properties both on ingestion and on contact. In higher concentrations the compound is effective against a wide range of insects, in very low dosages it only kills aphids. In dilutions of 0·01–0·02% the substance is efficient against numerous important aphids and does not affect the predators and parasites, e.g. the useful insects of the orchard fauna; it has, therefore a definite selective action. The substance is translocated through the plant in the organic and inorganic sapstream and thus has a certain "systemic effect". It acts mainly on the central nervous system of the insects and produces tetanus-like muscular convulsions which occur at short but regular intervals.

[1] G. Unterstenhöfer, l.c. – W. E. Ripper, R. M. Greenslade, and L. A. Lickerish, Nature *163*, 787 (1949). Bull. Ent. Research *40*, 4 (1949).

[2] P. E. Frohberger, l.c. – T. P. Dykstra and W. C. Whitacker, J. Agr. Res. *57*, 319 (1938). – F. C. Bowden, *Plant viruses and virus diseases* (Chronica Botanica Comp. Waltham, Mass. 1943), S. 70. – E. Gäumann, *Pflanzliche Infektionslehre* (Verlag Birkhäuser, Basel 1948), S. 111. – M. Büsgen, Jenaisch. Z. Naturwiss. Jena, 1891. – B. Huber, *Pflanzenphysiologie* (Verlag Quelle und Meier, Leipzig 1941), S. 51. – F. Stellwaag, *Pflanzenimpfung* (*Innere Therapie*) *und Assimilation*, Anz. Schädlingskde. *7*, 9, 59/60 (1943). – H. Weber, *Biologie der Hemipteren* (Springer-Verlag, Berlin 1930), S. 500. – J. G. Leach, *Insect transmission of plant diseases* (McGraw-Hill Book Comp. Inc., New York and London, 1940), S. 49. – J. Davidson, Ann. Appl. Biol. *10*, 35 (1923). – W. C. Bennet, J. Agr. Res. *48*, 665 (1934).

Congressus

U.S.A.

The XIIth International Congress of Pure and Applied Chemistry

will be held in New York City, U.S.A., in September 1951, in connection with the 75th Anniversary Meeting of the American Chemical Society. The Section of Biological Chemistry will welcome research papers on biochemistry (including fermentation, leather, and microbiology) from all research workers who plan to attend the New York Meetings. Application blanks and detailed information can be obtained by writing to Dr. Harry, L. Fisher, Administrative Assistant, 2101 Constitution Avenue, Washington 25, D. C., U.S.A., or to Dr. Severo Ochoa, Secretary, Section 3, Biological Chemistry, New York University College of Medicine, New York 16, N.Y.

Unsere medizinischen Spezialpräparate werden in enger Zusammenarbeit mit führenden Instituten und Kliniken mittels moderner Forschungsmethoden entwickelt.

Die Präparate unter der Marke

CILAG

werden von den Ärzten wegen ihrer stets gleichbleibenden hohen Qualität und Zuverlässigkeit allgemein geschätzt.

CILAG AKTIENGESELLSCHAFT SCHAFFHAUSEN

Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik

Journal of Applied Mathematics and Physics
Journal de Mathématiques et Physique appliquées
ZAMP

Editores: J. Ackeret, E. Baumann, P. Niggli, P. Scherrer, E. Stiefel, F. Stüssi, H. Ziegler *Redactor:* R. Sänger

Inhalt von Nr. II/1 (15. 1. 51):

Zusammenfassende Berichte: H. Rutishauser, A. Speiser, E. Stiefel: Programmgesteuerte digitale Rechengeräte (Elektronische Rechenmaschinen), III. Teil. – *Originalarbeiten:* H. Schürch: Beitrag zur Statik des Balkens von endlicher Breite (I. Teil). – A. O. Barut: Die Laufzeit, Elektronenbahnen, Kathodenfeldstärke und Potential der Raumladungsdiode für jede Anfangsgeschwindigkeit, Anfangsrichtung und Strom. – *Kurze Mitteilungen:* A. Stern: Zur Theorie der Wechselstromschaltungen für Entladungslampen. – E. Bas-Taymaz: Elektronenemissionsmessungen an Systemen Wolfram-Kohlenstoff und Molybdän-Kohlenstoff. – *Varia:* A. Pfluger: The International Congress of Mathematicians at Cambridge (Mass. USA.), August, 30th to September 6th., 1950. – *Buchbesprechungen.*

Jahresabonnement (6 Nummern): Inland Fr. 28.–, Ausland Fr. 34.–, Einzelnummer Fr. 6.–
Annual subscription (6 issues): Switzerland Fr. 28.–, other countries Fr. 34.–, single copy Fr. 6.–
Abonnement annuel (6 numéros): Suisse Fr. 28.–, étranger Fr. 34.–, le numéro Fr. 6.–.

Verlangen Sie bitte auf Grund dieses Inserates eine Gratis-Probenummer

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL / SCHWEIZ